Anwendungsmöglichkeiten der direkten quantitativen Dünnschichtchromatographie in der Stabilitätsanalytik von Arzneimitteln

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von

DIETER ROST
aus Apolda

Marburg 1979

Druck: Mauersberger, Marburg

Anwendungsmöglichkeiten der direkten quantitativen Dünnschichtchromatographie in der Stabilitätsanalytik von Arzneimitteln

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von

DIETER ROST
aus Apolda

Marburg 1979

Druck: Mauersberger, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Von dem Fachbereich Pharmazie und
Lebensmittelchemie der Philipps-Universität
Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am : 10. Juli 1979

Tag der mündlichen Prüfung : 10./11. Juli 1979

Berichterstatter : Prof. Dr. S. Ebel

Mitberichterstatter : Prof. Dr. P.H. List

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazeutische Chemie und Lebensmittelchemie der Philipps-Universität in Marburg/Lahn und an der Chemischen Untersuchungsstelle der Bundeswehr IV in Koblenz/Rhein auf Anregung und unter Leitung von

Herrn Professor Dr.S.Ebel.

Für alle Hilfe und jegliche Unterstützung möchte ich mich an dieser Stelle sehr herzlich bedanken !

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546011_0014

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	01
2.	Theoretische Betrachtungen	05
2.1.	Grundlagen der Densitometrie	05
2.2.	Auswertemethoden	07
2.2.1.	Wahl des geeigneten Auswerteverfahrens	07
2.2.2.	Eichfunktionen, Linearitätsbereich	08
2.2.3.	Auswertung mit externem Standard	09
2.2.4.	Auswertung mit internem Standard	13
2.2.5.	Response - Faktor	14
2.2.5.1.	Ableitung des Response - Faktors	15
2.2.5.2.	Versuchsergebnisse	17
2.3.	Fehlertheoretische Betrachtungen	20
2.3.1.	Fehlerfortpflanzung	20
2.3.2.	Auswirkung der Fehlerfortpflanzung bei der graphischen Auswertung von Remissionsgrad-Ortskurven	21
2.3.3.	Externer Standard	24
2.3.4.	Auswertung über zwei Standards	26
2.3.5.	Interner Standard	26
2.3.6.	Vergleich interner / externer Standard	27
3.	Anwendung der DC - Direktauswertung	31
3.1.	Stabilitätsuntersuchungen ohne gleichzeitige Erfassung der Abbauprodukte am Beispiel des Ephedrins	31
3.1.1.	Chromatographie	32

3.1.2.	Direkte Bestimmung	33
3.1.3.	Anfärbung	34
3.1.4.	Auswertung über Eichfunktionen	34
3.1.5.	Auswertung mit internem Standard	40
3.1.6.	Ergebnisse	40
3.2.	Stabilitätsuntersuchungen bei gleichzeitiger quantitativer Erfassung eines Abbauproduktes am Beispiel des Metamizols	43
3.2.1.	Chromatographie	44
3.2.2.	Auftragetechnik	44
3.2.3.	Auswertung über Eichfunktionen	45
3.2.4.	Auswertung mit internem Standard	48
3.2.5.	Ergebnisse	48
3.3.	Stabilitätsuntersuchungen bei gleichzeitiger quantitativer Erfassung herstellungsbedingter Nebenprodukte am Beispiel des Codeins	52
3.3.1.	Chromatographie	54
3.3.2.	Auswertung	54
3.3.3.	Ergebnisse	59
3.4.	Stabilitätsuntersuchungen bei gleichzeitiger quantitativer Erfassung herstellungsbedingter Nebenprodukte *und* lagerungsbedingter Abbauprodukte am Beispiel von Morphinhydrochlorid	61
3.4.1.	Chromatographie	64
3.4.2.	Auswertung	66
3.4.3.	Ergebnisse	73
4.	Erarbeitung haltbarkeitsspezifischer Untersuchungsvorschriften	77
5.	Beschreibung der Versuche	83
5.1.	Bestimmung von Ephedrin	83
5.2.	Bestimmung von Metamizol / 4-Methylaminophenazon	85
5.3.	Bestimmung von Codein / Methylcodein	86
5.4.	Bestimmung von Morphin und seinen Neben-/ Abbauprodukten	87

6. Zusammenfassung 89

- Literaturverzeichnis 91

- Lebenslauf 95

Verzeichnis der Symbole und Indices

M	Meßsignal
h	Meßgröße Peakhöhe
F, b*h	Meßgröße Fläche, berechnet aus Peakhöhe * Halbwertsbreite
c	Menge/Fleck , Auftragemenge
c_F	fehlerhaft angezeigte Menge
S_A	Meßsignal Analysenlösung
S_E	Meßsignal Eichlösung
S_S	Meßsignal Standard
φ	Differenzbetrag
σ	Fehler
k	konstanter Faktor
n	Anzahl der Einzelmessungen
E	Ergebnis
R	lineare Extinktion auf der Referenzbahn
P	lineare Extinktion auf der Probebahn
f	Response - Faktor
v	Volumen

Indices:

E,Eich	Eichlösung
X,A	Analysenlösung,Lösung der zu bestimmenden Substanz
St,S	Standard (interner)
i,int	interner Standard
e,ext	externer Standard
rel	relativ
r	Messung u.Auswertung vollautomatisch, rechnergesteuert

1. Einleitung

Arzneimittelstabilität ist ein Schlagwort, das nicht erst seit Inkrafttreten des Gesetzes zur Neuordnung des Arzneimittelrechts zum 1.Januar 1978 aktuelle Bedeutung gewonnen hat. Der Begriff der Arzneimittelstabilität umfaßt nach der Definition der USP XIX gleichbleibende chemische,physikalische, mikrobiologische, therapeutische und toxikologische Eigenschaften während der Verwendungsdauer des Präparates. In der Regel wird dieser Zeitraum von der Herstellung bis zur Anwendung durch den Patienten nur auf wenige Jahre begrenzt sein, für die der Hersteller auf Grund seiner gesetzlich vorgeschriebenen Stabilitätsanalytik die Verantwortung für eine einwandfreie Beschaffenheit übernimmt. Anders jedoch bei einer Lagerhaltung über zehn und mehr Jahre, wie sie z.B. im Rahmen der Bevorratung der Bundeswehr und des Zivilschutzes für den Verteidigungs- bzw. Katastrophenfall erforderlich ist. Hier muß durch gezielte, stabilitätsspezifische Haltbarkeitsuntersuchungen immer wieder die einwandfreie Beschaffenheit des Arzneimittelvorrates überprüft werden. Stabilitätsspezifische Untersuchungsmethoden, d.h. geeignete Analysenverfahren anzuwenden, die die am Wirkstoffmolekül eingetretenen Veränderungen erfassen können [THOMA 1978] . Routineuntersuchungsmethoden, wie sie in den werksinternen Prüfvorschriften

der pharmazeutischen Industrie zur Qualitätskontrolle zahlreich zu finden sind und hier sicherlich im gesteckten Rahmen eine ausreichende Aussagekraft besitzen, sind für die Stabilitätsanalytik ungeeignet. THOMA weist in diesem Zusammenhang auch auf zusätzliche analytische Probleme hin, die dadurch entstehen, daß der zu untersuchende Arzneistoff in der Regel nicht allein, sondern in Kombination mit anderen Arznei- und/oder Hilfsstoffen auftritt. Die Anwendbarkeit einer Methode kann deshalb, wie auch später am Beispiel des Metamizols zu sehen ist, nicht kritiklos auf Arzneimittelzubereitungen anderer Zusammensetzung übertragen werden.

Bedenkt man, daß es bei Stabilitätsuntersuchungen darauf ankommt entweder den unzersetzten Wirkstoff bzw. das Zersetzungsprodukt oder besser noch beide getrennt voneinander spezifisch quantitativ zu erfassen, so steht einem mit der quantitativen Direktauswertung von Dünnschichtchromatogrammen ein Analysenverfahren zur Verfügung, das diesen Anforderungen entspricht und bei geeigneter Fließmittelauswahl eine saubere Isolierung und genaue quantitative Bestimmung der Reaktionsprodukte liefert. Neben den von THOMA beschriebenen Verfahren der quantitativen Dünnschichtchromatographie durch Vergleich der Fleckengröße, durch in situ-Remissions- oder Transmissionsmessung zählt hierzu auch eine Auswertung über fotometrische Messung nach Elution der Flecke aus dem DC-Plattenmaterial. Von diesen vier Methoden ist die in situ-Remissionsmessung erfahrungsgemäß mit dem geringsten methodischen Fehler behaftet. In der vorliegenden Arbeit soll deshalb am Beispiel von vier Arzneistoffen - dem Ephedrin, dem Metamizol, dem Codein

und dem Morphin - gezeigt werden, welche Möglichkeiten sich bei der Anwendung dieser Methode in der Stabilitätsanalytik bieten und fehlertheoretische Betrachtungen hierzu durchgeführt werden.

2. Theoretische Betrachtungen

2.1. Grundlagen der Densitometrie

Die Dünnschichtchromatographie ist in der qualitativen Arzneimittelanalyse als Identitätsprobe bereits seit vielen Jahren zur Routine geworden. In Folge hierzu setzt sich auch die quantitative Dünnschichtchromatographie mittels in situ-Remissionsmessung immer mehr durch. Voraussetzung hierfür ist jedoch ein optimales chromatographisches Verhalten der Substanz, nicht zuletzt beeinflußt durch die richtige Wahl des Lösungsmittels, des Plattenmaterials und des Laufmittels. Bereits geringfügige Änderungen der Volumenverhältnisse in Fließmittelgemischen können zu Tailing, Bildung einer ß-Front oder Verschiebungen im Trennverhalten führen. Je runder jedoch ein Fleck ist, und je präziser die Trennung erfolgt, desto besser läßt er sich densitometrisch auswerten, und desto mehr wird die aufgezeichnete Ortskurve der angestrebten Idealkurve entsprechen.
Wesentlich für eine gute Auswertung ist zudem auch die spezifische Absorption einer Substanz. Je höher die spezifische Absorption einer zu messenden Substanz ist, desto niedriger kann die aufzutragende Menge pro Fleck gewählt werden, ohne dabei Einbußen hinsichtlich der Auswertequalität hinnehmen

zu müssen. Ist die Absorption jedoch zu niedrig oder stören sonstige Faktoren die Direktauswertung, so ist eine Anfärbung der Substanz mit einem geeigneten Reagenz möglich. Die homogene Anfärbung einer Substanz ist allerdings bis heute ein Problem geblieben, für das es keine befriedigende Lösung gibt, wobei in erster Linie Ungleichheiten im Untergrund Anlaß zu neuen Fehlern geben.

Über die Grundlagen der Densitometrie haben KUSSMAUL [1972] und HEROLD [1975] in vorhergehenden Arbeiten ausführlich berichtet. Der Vollständigkeit halber sei aber dennoch das Arbeitsprinzip des bei den nachfolgenden Versuchen angewandten SCHOEFFEL SD 3000 kurz angesprochen:

Beim SD 3000 handelt es sich um ein Einwellenlängen-Zweistrahlgerät, dessen monochromatischer Lichtstrahl in einen Meß- und einen Vergleichsstrahl aufgeteilt wird. Die DC-Platte wird bei entsprechender Auftragung der Proben so positioniert, daß der Meßstrahl auf eine Probebahn und der Vergleichsstrahl auf eine substanzfreie Bahn treffen. Die jeweilige Remission wird mit zwei getrennten Photomultipliern gemessen, die bezüglich ihres Ausgangssignals vor der Messung im Verhältnis 1 : 1 abgeglichen worden sind. Da die nebeneinanderliegenden Streifen bis auf die aufgetragene Substanz nahezu gleich sind, werden Veränderungen in der Remissionsenergie der Substanz zugeordnet, direkt abhängig von der Spezifität und aufgetragenen Menge der Substanz sowie der Wellenlänge. Die von einem Schreiber aufgezeichneten Remissionsgrad-Ortskurven von Vergleich und Analyse werden gegeneinander ausgewertet.

2.2. Auswertemethoden

2.2.1. Wahl des geeigneten Auswerteverfahrens

Bei gleich optimalen chromatographischen Bedingungen ist die Wahl des geeigneten Auswerteverfahrens von der zur Verfügung stehenden apparativen Ausrüstung abhängig. Steht lediglich ein DC-Fotometer mit nachgeschaltetem Schreiber zur Verfügung, d.h. die Auswertung erfolgt aus der registrierten Remissionsgrad-Ortskurve, so ist eine Auswertung über die Peakhöhe in jedem Fall vorzuziehen. Es ist fehlertheoretisch begründbar, daß die oftmals durchgeführte graphische Auswertung der Remissionsgrad-Ortskurve bei der näherungsweisen Bestimmung der Fläche über das Produkt aus Peakhöhe*Halbwertsbreite zu größeren Fehlern führen muß (EBEL , HOCKE 1978). Nach den Gesetzen der Fehlerfortpflanzung [LUDWIG 1969 ; TOPPING 1976] führt darüber hinaus eine Auswertung über das Peakhöhen- oder Flächenquadrat zu einer Verdoppelung des Fehlers.
Steht ein Integrator zur Verfügung, so wird bei richtiger Ausnutzung und Optimierung des Meßverfahrens eine Flächenbestimmung zu besseren Ergebnissen führen. Allerdings ist darauf zu achten, daß eine hohe Scangeschwindigkeit über die Zeitkonstanten des DC-Fotoverstärkers und des Integrators zu systematischen Fehlern Anlaß geben kann (EBEL , HEROLD , HOCKE 1976a ; EBEL , HOCKE 1978), was gerade bei den unterschiedlich großen Signalen in der Stabilitätsanalytik von Bedeutung ist. Basislinienstörungen können durch Scannen in und gegen die Entwicklungsrichtung und anschließende Mittelwertbildung zum überwiegenden Teil eliminiert werden (EBEL , HEROLD 1974).

Auch die Frage, ob über internen oder externen Standard ausgewertet werden soll, ist von der apparativen Ausstattung abhängig. Ist das Meßverfahren genauer als die Auftragetechnik, so ist die Methode mit internem Standard vorzuziehen (vergl. Kap. 2.3.3. - 2.3.6.). Es läßt sich nämlich zeigen, daß bei der näherungsweisen Flächenbestimmung bei der graphischen Auswertung über den internen Standard ein größerer Fehler resultieren kann als bei Anwendung eines externen Standards. Darüber hinaus ist zu beachten, daß die Response-Faktoren nicht konstant sind, sondern eine Abhängigkeit zur aufgetragenen Menge aufweisen (vergl. Kap. 2.2.5.).
Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse sind in der Regel bei graphischer Auswertung unter Verwendung eines externen Standards erhalten worden, jedoch wurde bei Verwendung eines vollrechnergesteuerten DC-Fotometers (EBEL , HOCKE 1976 , 1977 ; EBEL , GEITZ , HOCKE 1979) die Auswertung der Peakhöhe unter Anwendung der Methode des internen Standards vorgenommen.

2.2.2. Eichfunktionen , Linearitätsbereich

Zwischen der Fläche unter der Remissionsgrad-Ortskurve und der Substanzmenge im DC-Fleck besteht kein theoretisch begründbarer funktioneller Zusammenhang. Man arbeitet deshalb fast stets mit empirischen Funktionen, wobei sich ein praktisch linearer Zusammenhang ergibt, wenn man F^2 gegen c aufträgt (TAUSCH 1971). Lediglich bei niedrigen Konzentrationen ergibt sich eine lineare Abhängigkeit der Fläche oder

auch der Peakhöhe von der Substanzmenge (BETHKE,FREI 1974 ; EBEL, HEROLD, HOCKE 1976b) [KUSSMAUL 1972]. Es ist deshalb in jedem Fall erforderlich, Linearitätsbetrachtungen anzustellen und nach Möglichkeit im direkten linearen Bereich zu arbeiten, da die Auftragung von F^2 gegen c fehlertheoretisch mit einer Verdoppelung des Standardfehlers zwangsläufig verknüpft ist. Da es in der Stabilitätsanalytik jedoch immer von Vorteil ist, Hauptkomponente *und* Zersetzungsprodukt quantitativ zu bestimmen, wird dieser Forderung nicht immer Rechnung getragen werden können, es sei denn, man arbeitet mit zwei Platten im jeweils optimalen Konzentrationsbereich.
In diesem Zusammenhang muß darauf hingewiesen werden, daß es allgemein üblich geworden ist, die aufgetragene Menge mit dem Index " c " für Konzentration zu bezeichnen. In Wirklichkeit werden jedoch in der quantitativen DC keine Konzentrationen sondern die Belegungsdichte pro Quadratzentimeter DC-Platte, ausgedrückt durch die Auftragemenge in µg bzw. ng/Fleck, gemessen.

2.2.3. Auswertung mit externem Standard

Bei der Auswertemethode mit externem Standard geht man bei der Auftragung der Eich- und Analysenbahnen z.B. nach Abb.1 vor, d.h. es wird alternierend Eich- und Analysenlösung aufgetragen. Prinzipiell können auch mehrere Analysen auf einen Standard bezogen werden. Das Verfahren ist jedoch nur anwendbar, wenn die Messung im linearen Arbeitsbereich erfolgt. In der DC treten jedoch nichtlineare Eichfunktionen auf, sodaß eine Anwendung der Auswertung über die Methode des externen

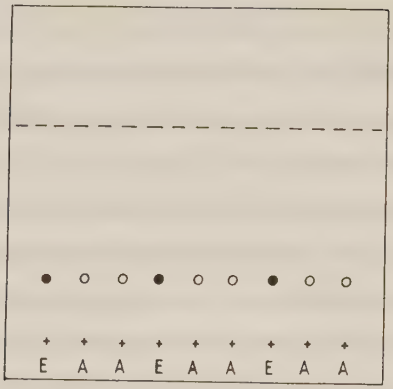


Abb. 1 : *Beispiel für die Auftragung bei Auswertung mit externem Standard für die Kontrollanalytik*

Standards eigentlich garnicht möglich ist. Zeigen dagegen Standard und Analyse annähernd gleich große Signale, so wird der durch den nicht-linearen Verlauf der Eichfunktion bedingte Fehler jedoch klein, da der Fehlerterm (c_F) gegen Null geht, wenn S_A / S_E gegen 1 läuft (vergl. Abb. 2 u.3 sowie die Gleichungen (1) bis (8)).

In der Praxis ist die Anwendung dieser Methode daher nur möglich, wenn der zu bestimmende Gehalt einer Substanz annähernd bekannt ist, sodaß die Einwaage des Vergleichs entsprechend gewählt werden kann. Die Einschachtelung eines Wertes durch zwei Vergleichswerte, bei denen die Einwaagen einmal knapp unter, zum anderen knapp über dem zu erwartenden Wert liegen, führt ebenfalls zu einer Verringerung des Fehlers.

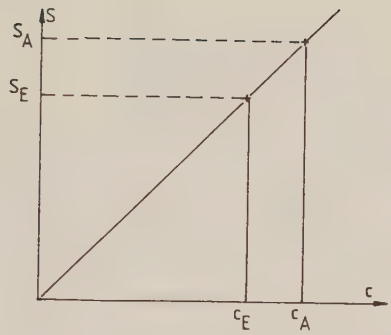


Abb. 2 : Verhältnis Meßsignal/Substanzmenge im linearen Bereich

$$\frac{c_A}{c_E} = \frac{S_A}{S_E} \qquad (1)$$

$$c_A = c_E \times \frac{S_A}{S_E} \qquad (2)$$

Indices:

c	Substanzmenge im Fleck
S	Meßsignal
A	Analyse
E	Eichlösung
F	angezeigte fehlerhafte Menge im Fleck
φ	Differenz zwischen ermittelter u.tatsächl. Eichgeraden

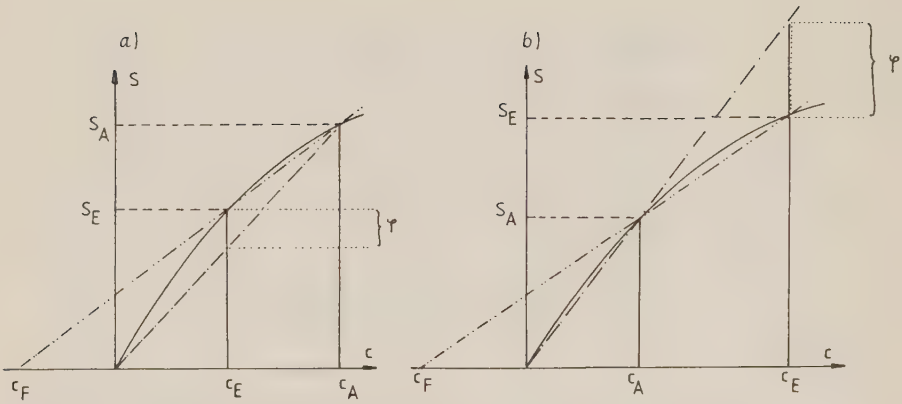


Abb. 3 : Verhältnis Meßsignal/Substanzmenge im nicht-linearen Bereich
a) Analysensignal größer als Eichsignal
b) Analysensignal kleiner als Eichsignal

für $S_A > S_E$:

$$\frac{c_A + c_F}{c_E + c_F} = \frac{S_A}{S_E} \qquad (3)$$

$$c_A = \frac{S_A}{S_E} \times c_E + \frac{S_A}{S_E} \times c_F - c_F \qquad (4)$$

$$\varphi = \frac{S_A}{S_E} \times c_F - c_F \qquad (5)$$

für $S_A < S_E$:

$$\frac{c_A - c_F}{c_E - c_F} = \frac{S_A}{S_E} \qquad (6)$$

$$c_A = \frac{S_A}{S_E} \times c_E - \frac{S_A}{S_E} \times c_F - c_F \qquad (7)$$

$$\varphi = -\left[\frac{S_A}{S_E}\right] \times c_F + c_F \qquad (8)$$

2.2.4. Auswertung mit internem Standard

Zur Ausschaltung des Auftragefehlers empfiehlt sich die Auswertung mit Hilfe eines internen Standards (EBEL, HEROLD 1975a, 1975b ; KLAUS 1965, 1971). Bei dieser Methode wird auf der Eich- und Analysenbahn dieselbe Menge einer zusätzlichen Substanz mitchromatographiert. Die als Standard einge-

Abb. 4 : Beispiel für die Auftragung bei Auswertung mit internem Standard

setzte Substanz sollte dabei möglichst ähnliche spektrale Eigenschaften wie die zu bestimmende Substanz besitzen. Die

aufzutragende Menge sollte so bemessen sein, daß Substanz und Standard nahezu gleich große Signale ergeben, da hierbei ähnliche Einschränkungen gelten wie bei der Auswertung mit externem Standard. Auf das Signal dieses internen Standards wird dann die Auswertung entsprechend den Gleichungen (9) bis (11) bezogen. Die Größe f wird in Analogie zur Gaschromatographie [KAISER 1965] als Response-Faktor bezeichnet.

$$f = \frac{c_{X,E}}{c_{St,E}} \cdot \frac{h_{St,E}}{h_{X,E}} \qquad (9)$$

$$f' = f \cdot c_{St,E} = c_{X,E} \cdot \frac{h_{St,E}}{h_{X,E}} \qquad (10)$$

$$c_{X,A} = f' \cdot \frac{h_{X,A}}{h_{St,A}} \qquad (11)$$

2.2.5. Response - Faktor

Im Rahmen der Fehlerbetrachtung der Methode des internen Standards ergibt sich das Problem der Konzentrationsabhängigkeit des Eichfaktors. Die Frage hiernach stellt sich insbesondere dann, wenn man die quantitative DC nicht nur für die Überprüfung bekannter Wirkstoffgehalte in pharmazeutischen Zubereitungen (Content Uniformity Test) anwenden will, sondern, wenn möglich, auch für die Bestimmung unbekannter Mengen in Stabilitätsuntersuchungen oder Rückstandsbestimmungen in biologischem Material.

Benutzt man die Methode des internen Standards in der Gas-

oder Hochdruckflüssigchromatographie, so ergibt sich eine gute Linearität des Response-Faktors (JANSSEN 1977). Bei Anwendung in der Dünnschichtchromatographie ist der Response-Faktor unter den gleichen Bedingungen jedoch nicht konstant, sodaß die mengenmäßige Bestimmung einer Verbindung in der gewünschten Form nicht erreicht werden kann.

2.2.5.1. Ableitung des Response - Faktors

Der Response-Faktor f ergibt sich aus (12) .

$$f = \frac{c_{X,Eich}}{c_{S,Eich}} \times \frac{M_{S,Eich}}{M_{X,Eich}} \qquad (12)$$

Sein zahlenmäßiger Wert entspricht dem Verhältnis der Meßsignale von Standard und Analyse bei gleicher Konzentration in der Eichlösung (13).

$$f_{(c_{X,Eich} = c_{S,Eich})} = \frac{M_{S,Eich}}{M_{X,Eich}} \qquad (13)$$

Im Idealfalle, also bei gleicher Peakhöhe oder Peakfläche von Standard und Analyse, beträgt der Response-Faktor = 1. Die graphische Darstellung des Response-Faktors entspricht dabei einer Geraden im Abstand $\frac{S_S}{S_A}$ bei $c_{A,Eich} = c_{S,Eich}$ parallel zur x-Achse.

Da $\frac{S_{S,Eich}}{c_{S,Eich}}$ konstant bleibt, ist die Konstanz des Response-Faktors unmittelbar von der Linearität des Verhältnisses der Auftragemenge der zu untersuchenden Substanz im Fleck zum Meßsignal abhängig. Ist diese Linearität nicht mehr gegeben, muß zwangsläufig eine Änderung des Response-Faktors eintreten.

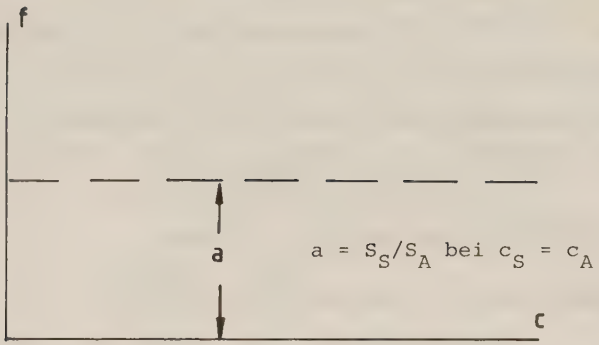


Abb. 5 : *Graphische Darstellung des Response-Faktors im Verhältnis zur Auftragemenge*

Es ist bekannt, daß die Linearität des Verhältnisses Auftragemenge/Meßsignal in der quantitativen DC (Densitometrie) auf einen Bereich beschränkt ist, der sich in der Regel von der Nachweisgrenze bis zum zehnfachen derselben erstreckt. Wird dieser Bereich verlassen, müssen die Eichbereiche mit steigender Substanzmenge/Fleck immer kürzer gefaßt werden, wenn man ein Abflachen der Kurve vermeiden will. Die für die einzelnen Bereiche erstellten Eichfunktionen unterscheiden sich dabei in ihrem Anstiegswinkel zur x-Achse. Als interner Standard kommt eine Substanz nur dann in Frage, wenn sie möglichst gleiche spektrale Eigenschaften wie die Analysensubstanz aufweist. Man wird deshalb auch die Konzentration des internen Standards so wählen, daß sie der aufgetragenen Menge der Analysensubstanz entspricht. Bei bekannter Konzentration der zu untersuchenden Substanz ist dies ohne Schwierigkeiten möglich.

Anders in der Stabilitätsanalytik, wo z.B. zu Beginn einer Untersuchung der Gehalt an zu erwartendem Zersetzungsprodukt oftmals nicht bekannt ist. Da die gewählte Konzentration des internen Standards nur mit einem bestimmten Eichbereich der gesuchten Substanz korrespondiert, muß der Response-Faktor bei Verlassen dieses Eichbereichs eine Änderung erfahren.

2.2.5.2. Versuchsergebnisse

Zur Überprüfung, welche Abhängigkeit zwischen Response-Faktor und Auftragemenge besteht, wurden Meßreihen aufgestellt, bei denen sowohl die zugegebene Menge des Standards bei konstantem Analysengehalt als auch die aufgetragene Analysensubstanzmenge bei konstantem Standard verändert wurde. In beiden Fällen ließ sich eine umgekehrte Abhängigkeit des Response-Faktors zum Verhältnis der Auftragemenge des Standards zur Auftragemenge der Analyse feststellen. D.h., ist die aufgetragene Substanzmenge des Standards im Verhältnis zur Auftragemenge der Analyse zu hoch gewählt, liegt der Response-Faktor zu niedrig und umgekehrt. Daraus ergibt sich unter Zugrundelegung von (13)

$$f_{(c_S > c_X)} < \frac{M_S}{M_X} \qquad (14)$$

bzw.

$$f_{(c_S < c_X)} > \frac{M_S}{M_X} \qquad (15).$$

Da die Linearität der Substanzen mit abnehmender Auftragemenge zunimmt, ist es bei unbekannten Gewichtsverhältnissen immer von Vorteil die Auftragemenge des internen Standards etwas

höher zu veranschlagen als zu niedrig. Es hat sich gezeigt, daß die Abweichungen des Response-Faktors dabei weniger hoch sind als im umgekehrten Falle. Eine Wiederholung der Analyse mit angepaßtem Standard ist zum Erhalt genauer Werte unbedingt zu empfehlen. Versuche haben ferner gezeigt, daß bei der Linearität des Response-Faktors bei einer Auswertung über die Peakfläche gegenüber einer Auswertung über die Peakhöhe eine geringfügige Verbesserung zu verzeichnen ist. Ein zu Beginn der Versuche sich abzeichnender anderer Verlauf der Linearitätsgerade des Response-Faktors bei Auswertung der Meßsignale nach geänderter elektronischer Aufbereitung (Messung des linearen Reflexionsverhältnisses) bestätigte sich nicht. Ebenso konnte eine Geräteabhängigkeit nicht gefunden werden. Die Auswertung über das Quadrat der Meßsignale bestätigte die Abweichungen des Response-Faktors im zuvor beschriebenen Sinne. Um hierbei theoretisch eine Gerade zu erhalten, müssen natürlich auch die Auftragemengen c in Gleichung (12) quadriert werden.

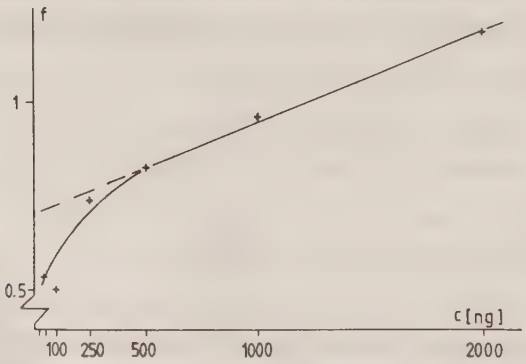


Abb. 6 : *Response-Faktor , HPTLC-Methode ; Interner Standard 500 ng Analysensubstanz R 31520 , 25 bis 2000 ng (JANSSEN 1977)*

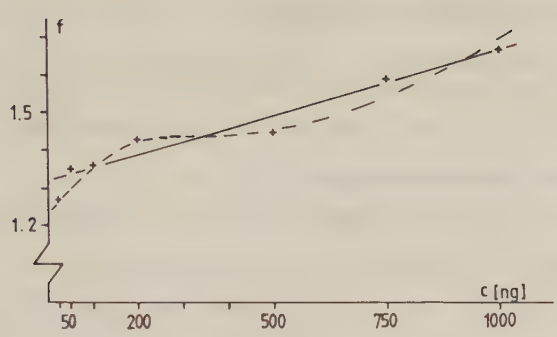


Abb. 7 : Response-Faktor , DC , Auswertung über die Höhe
Interner Standard 250 ng Coffein
Analysensubstanz 25 bis 1000 ng Phenacetin

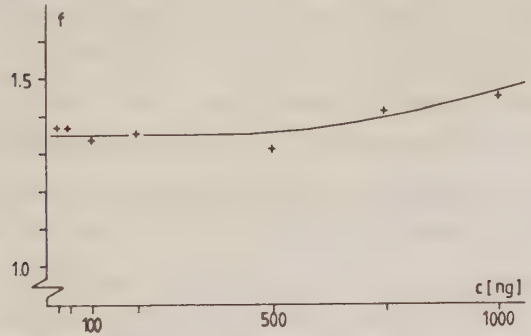


Abb. 8 : Response-Faktor , DC , Auswertung über die Peakfläche
Interner Standard und Analysensubstanz wie Abb. 7

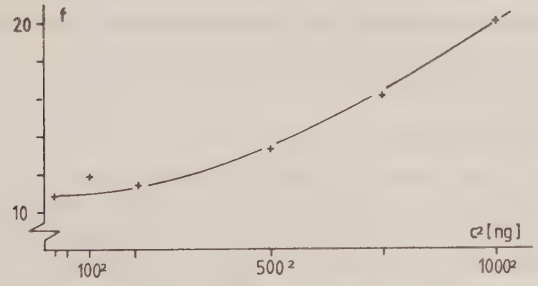


Abb. 9 : Response-Faktor , DC , Auswertung über Höhe² , aufgetragen gegen c²
Interner Standard und Analysensubstanz wie Abb.7

2.3. Fehlertheoretische Betrachtungen

Die quantitative Direktauswertung von Dünnschichtchromatogrammen wird heute in vielen Fällen als Routineverfahren angewendet. In der Qualitätsanalytik z.B. der pharmazeutischen Industrie kann man davon ausgehen, daß die vorliegende Analysenprobe einen vorgegebenen definierten Gehalt aufweist. Hierdurch bedingt kann man auf das Erstellen einer Eichkurve verzichten und entweder im eingeschränkten Mengenbereich einen linearen Zusammenhang zwischen Meßgröße (Peakhöhe, Fläche) und Substanzmenge im DC-Fleck annehmen (EBEL, HEROLD 1975c) [MC.MULLAN, HEVERAN in TOUCHSTONE 1975] oder aber Eichfleck und Analysenfleck miteinander vergleichen. Beim direkten Vergleich (externer Standard) müssen lediglich zwei Meßwerte erfaßt werden, doch gehen Fehler der Auftragetechnik unmittelbar in das Ergebnis ein. Setzt man einen internen Standard der Eich- und Analysenlösung zu, so wird der Auftragefehler eliminiert, doch ist zu berücksichtigen, daß in diesem Falle vier Meßwerte notwendig sind, die jeweils fehlerbehaftet sein können. Über die Genauigkeit beider Verfahren hört man immer wieder unterschiedliche Aussagen. Es sollen deshalb im folgenden beide Methoden fehlertheoretisch verglichen werden.

2.3.1. Fehlerfortpflanzung

Jede Messung ist á priori mit einem gewissen statistischen Fehler behaftet. Diese Meßfehler machen sich selbstverständlich im Ergebnis bemerkbar, wobei ganz bestimmte Gesetzmäßigkeiten für die Fortpflanzung des Meßfehlers in das Ergebnis

bestehen und im Gauss´schen Fehlerfortpflanzungsgesetz definiert sind durch die Gleichung (16)[CLIFFORD 1973; LUDWIG 1969; TOPPING 1976]

$$\sigma_E^2 = \sigma_p^2 \left(\frac{dE}{dp}\right)^2 \qquad (16),$$

wobei σ_E = Fehler im Ergebnis,

σ_p = Fehler im Parameter

und $\frac{dE}{dp}$ = abgeleiteter Funktion aus dem Verhältnis E zu p

entsprechen. Sind in einem Rechengang mehrere fehlerbehaftete Parameter,folgt das Fehlerfortpflanzungsgesetz der allgemeinen Gleichung

$$\sigma_E^2 = \sum_{i=1}^{n} \sigma_{p_i}^2 \cdot \left(\frac{\delta E}{\delta p_i}\right)^2 \qquad (17),$$

wobei $\frac{\delta E}{\delta p_i}$ = der partiellen Ableitung der Funktion aus dem Verhältnis E zu p entspricht.

2.3.2. Auswirkung der Fehlerfortpflanzung bei der graphischen Auswertung von Remissionsgrad-Ortskurven

EBEL und HOCKE (1978) zeigen die Anwendung aber auch die Konsequenzen der Fehlerfortpflanzung in der direkten quantitativen DC auf. Während in der Gaschromatographie bereits elektronische Integratoren sowie computergesteuerte Analysensysteme eingesetzt werden, wird in der Dünnschichtchromatographie heutzutage überwiegend noch die graphische Auswertung der aufgezeichneten Ortskurve über Peakhöhe oder - fläche angewandt.

Beide Methoden sind auch in der GC allseits bekannt. Bei der Auswertung über die Peakhöhe kommen dabei zwei Fehlerquellen zum Tragen: die Festlegung des oberen Peakendes, bedingt durch die Schreiberlinienbreite, zum zweiten die Bestimmung der Grundlinie, zusätzlich bedingt durch das Grundrauschen. Geht man davon aus, daß eine Auswertung der registrierten Meßkurve auf $\pm$ 0,3 mm genau erfolgen kann, so beträgt der absolute Fehler bei der Peakhöhenbestimmung $0{,}3 * \sqrt{2} \sim 0{,}45$ mm. Vergleicht man den relativen Fehler eines Peaks mit vollem Schreiberausschlag (15cm) mit dem einer Peakhöhe von 5 cm, so läßt sich hier unter Zugrundelegung der Gleichung (18) ein prozentualer

$$\sigma_{c,rel} = \frac{k \cdot \sigma_h}{k \cdot h} = \frac{\sigma_h}{h} \qquad (18)$$

Anstieg des Fehlers auf ~ 0,7 % feststellen. Daraus folgt, daß mit abnehmenden Signal/Rausch-Verhältnis und zunehmender Schreiberlinienbreite nur ein relativ geringer Fehleranstieg zu beobachten ist. Bei der Auswertung über die Peakfläche nach Gleichung (19) kommen zu den Fehlern der Höhenbestimmung

$$\sigma^2_{c,rel} = \frac{\sigma^2_h}{h^2} + \frac{\sigma^2_b}{b^2} \qquad (19)$$

noch die der Breitenbestimmung b hinzu. Es ist leicht einzusehen, daß der Fehler deshalb in jedem Fall größer sein muß, als bei der Bestimmung über die Peakhöhe. Bei einer angenommenen Peakhöhe von 15 cm und einer Halbwertsbreite von 10 cm (ein im Routinebetrieb wohl nie auftretender Wert) würde sich bei gleich optimalen Meßbedingungen wie zuvor ein Fehler

von 0,54 % ergeben. Mit abnehmender Halbwertsbreite nimmt der Fehler jedoch rasch zu (Abb. 10).

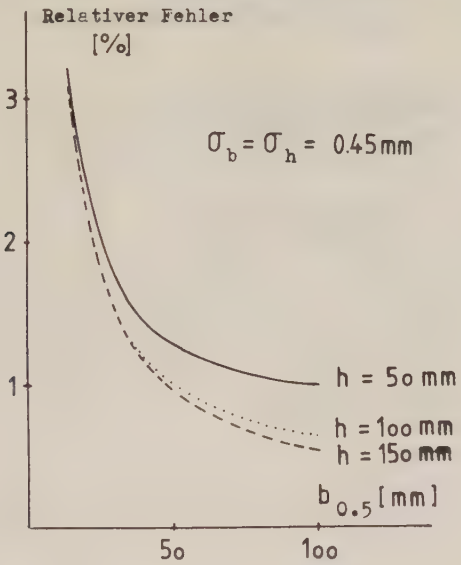


Abb. 10 : *Abhängigkeit des relativen Fehlers bei der Gehaltsbestimmung unter Anwendung der Näherung Peakhöhe * Halbwertsbreite*

In Wirklichkeit ist der Fehler noch etwas größer, da noch andere Fehler, z.B. die Auswirkung des Fehlers in der Höhenmessung auf die Halbwertbreite, mit in Rechnung gezogen werden müssen. Fehler im Endergebnis, die durch den Verstärker oder Schreiber verursacht worden sind, können beim Vergleich interner/externer Standard außer acht gelassen werden.

2.3.3. Externer Standard

Der Auswertung mit externem Standard (s.a.Kap. 2.2.3.) liegt folgende einfache Rechnung nach dem Strahlensatz zugrunde

$$\frac{c_{X,A} \cdot v_A}{c_{X,E} \cdot v_E} = \frac{h_{X,A}}{h_{X,E}} \qquad (20)$$

$$c_{X,A} = \frac{v_E \cdot c_{X,E}}{v_A} \cdot \frac{h_{X,A}}{h_{X,E}} \qquad (21).$$

In der Praxis verwendet man die einfachere Formel

$$c_{X,A} = c_{X,E} \cdot \frac{h_{X,A}}{h_{X,E}} \qquad (22),$$

da angenommen wird, daß $v_E = v_A$ ist. Für die Fehlerfortpflanzungsrechnungen muß man jedoch von (21) ausgehen, da v_A und v_E unterschiedlich und ebenfalls jeweils fehlerbehaftet sind. In völlig analoger Weise können auch die Flächen ausgewertet werden. In der Fehlerfortpflanzung ist dann lediglich das Symbol h durch F zu ersetzen; die Ableitungen ändern sich jedoch nicht.

Da jede dieser Größen fehlerbehaftet ist - lediglich der Fehler in $c_{X,E}$ ist in der Regel vernachlässigbar - , gilt für die Fehlerfortpflanzung der allgemeine Ansatz

$$\sigma^2_{c,A} = \sigma^2_h \left[\left(\frac{\delta c_{X,A}}{\delta h_{X,A}} \right)^2 + \left(\frac{\delta c_{X,A}}{\delta h_{X,E}} \right)^2 \right] + \sigma^2_v \left[\left(\frac{\delta c_{X,A}}{\delta v_A} \right)^2 + \left(\frac{\delta c_{X,A}}{\delta v_E} \right)^2 \right] \qquad (23)$$

$$\sigma^2_{c,A} = \sigma^2_h \left[\left(\frac{c_{X,E} \cdot v_E}{h_{X,E}\, v_A} \right)^2 + \left(\frac{h_{X,A}\, c_{X,E}\, v_E}{h^2_{X,E}\, v_A} \right)^2 \right]$$

$$+ \sigma^2_v \left[\left(\frac{h_{X,A}\, c_{X,E}\, v_E}{h_{X,E}\, v^2_A} \right)^2 + \left(\frac{h_{X,A}\, c_{X,E}}{h_{X,E}\, v_A} \right)^2 \right] \qquad (24)$$

Geht man davon aus, daß in der normalen Routineanalyse v_A und v_E sowie $h_{X,A}$ und $h_{X,E}$ in der gleichen Größenordnung liegen, so gehen (24) und (25) bzw. (26) in den einfacheren Ausdruck (28) über. Der relative Fehler ergibt sich somit zu (29).

$$v_E \approx v_A = v \qquad (25)$$

$$h_{X,E} \approx h_{X,A} = h \qquad (26)$$

$$\sigma^2_{c,A} = \sigma^2_h \left[\frac{c^2_{X,E}}{h^2} + \frac{c^2_{X,E}}{h^2} \right] + \sigma^2_v \left[\frac{c^2_{X,E}}{v^2} + \frac{c^2_{X,E}}{v^2} \right] \qquad (27)$$

$$\sigma^2_{c,A} = \sigma^2_h \cdot \frac{2c^2_{X,E}}{h^2} + \sigma^2_v \cdot \frac{2c^2_{X,E}}{v^2} \qquad (28)$$

$$\sigma^2_{c,A,rel} = \frac{2\sigma^2_h}{h^2} + \frac{2\sigma^2_v}{v^2} \qquad (29)$$

Man beachte, daß der Fehler im Auftragevolumen in der Fehlergleichung enthalten ist. Im Gegensatz zur Potentiometrie

(EBEL, GLASER, MOHR 1978; EBEL, GLASER, SEURING 1978) oder Spektroskopie [STEFFENS 1977; WEITKAMP, BARTH 1976] ist dieser Volumenfehler bei Routineanalysen in der Dünnschichtchromatographie - ebenso wie in der HPLC oder auch GC - jedoch nicht vernachlässigbar.

2.3.4. Auswertung über zwei Standards

Häufig wird in der Praxis das Verfahren angewendet, eine Analysenmessung auf zwei Eichmessungen zu beziehen. Dieses Verfahren bringt jedoch keine Verbesserung im Hinblick auf statistische Fehler. Die allgemeine Formel für diese Auswertung

$$c_{X,A} = \frac{1}{2}\left[\frac{h_{X,A}}{h_{X,E1}} \cdot \frac{v_{E1} \cdot c_{X,E}}{v_A} + \frac{h_{X,A}}{h_{X,E2}} \cdot \frac{v_{E2} \cdot c_{X,E}}{v_A}\right] \qquad (30)$$

führt nämlich zu dem durch Gleichung (31) gegebenen Fehler;

$$\sigma^2_{c,A,rel} = \frac{1}{2}\left[\frac{4\sigma^2_h}{h^2} + \frac{4\sigma^2_v}{v^2}\right] \qquad (31)$$

dieser ist identisch mit Gleichung (29).
Der Einfluß dieser Auswertung auf systematische Fehler soll hier nicht berücksichtigt werden.

2.3.5. Interner Standard

Die Berechnung des Analysenergebnisses bei Auswertung mit Hilfe eines internen Standards (s.a. Kap. 2.2.4.) erfolgt nach Gleichung (32), die sich aus dem allgemeinen Ansatz (33) ableitet. Bei dieser Methode geht somit das Auftragevolumen nicht in die Auswertung ein.

$$\frac{\frac{c_{X,A} \cdot V_A}{h_{X,A}}}{\frac{c_{S,A} \cdot V_A}{h_{S,A}}} = \frac{\frac{c_{X,E} \cdot V_E}{h_{X,E}}}{\frac{c_{S,E} \cdot V_E}{h_{S,E}}} \qquad (32)$$

$$c_{X,A} = \frac{h_{X,A}}{h_{S,A}} \cdot \frac{h_{S,E}}{h_{X,E}} \cdot c_{X,E} \qquad (33)$$

Für die Fehlerfortpflanzung gilt dann unter denselben Voraussetzungen wie oben :

$$\sigma^2_{c,A} = \sigma^2_h \left[\left(\frac{h_{S,E}}{h_{S,A} \cdot h_{X,E}} \right)^2 + \left(\frac{h_{X,A}}{h_{S,A} \cdot h_{X,E}} \right)^2 \right.$$

$$\left. + \left(\frac{h_{X,A} \cdot h_{S,E}}{h_{X,E} \cdot h^2_{S,A}} \right)^2 + \left(\frac{h_{X,A} \cdot h_{S,E}}{h_{S,A} \cdot h^2_{X,E}} \right)^2 \right] \cdot c^2_{X,E} \qquad (34)$$

$$\sigma^2_{c,A} = \sigma^2_h \cdot \frac{4}{h^2} \cdot c^2_{X,E} \qquad (35)$$

$$\sigma^2_{c,A,rel} = \frac{4\sigma^2_h}{h^2} \qquad (36).$$

2.3.6. Vergleich interner / externer Standard

Beim Analysenergebnis interessiert fast stets der relative Fehler, d.h. Gleichung (29) und (36) lassen sich direkt miteinander vergleichen.

$$\sigma^2_{ext} = \frac{2\sigma^2_h}{h^2} + \frac{2\sigma^2_v}{v^2} \qquad (29)$$

$$\sigma^2_{int} = \frac{4\sigma^2_h}{h^2} \qquad (36)$$

Dieser Vergleich führt dabei zu folgendem Ergebnis (EBEL, GLASER, ROST 1978):
Ist der Meßfehler kleiner als der Volumenfehler bei der Auftragung, so ist eine Auswertung mit internem Standard zuverlässiger als die Methode des externen Standards.

$$\frac{\sigma_h}{h} < \frac{\sigma_v}{v} \longrightarrow \sigma_{int} < \sigma_{ext} \qquad (37)$$

Diese Voraussetzung ist bei einer rechnergesteuerten Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen (EBEL, HOCKE 1976, 1977) praktisch immer und bei der Verwendung von Integratoren bei optimierter Chromatographie und Messung fast stets gegeben [HEROLD 1975] . Wird jedoch der Meßfehler größer als der Auftragefehler, d.h. gilt

$$\frac{\sigma_h}{h} > \frac{\sigma_v}{v} \longrightarrow \sigma_{int} > \sigma_{ext} \qquad (38),$$

so folgt unmittelbar, daß eine Auswertung über die Methode des externen Standards genauer und zuverlässiger wird. Diese Gegebenheit liegt vor, wenn über die Näherung Peakhöhe * Halbwertsbreite graphisch ausgewertet wird oder wenn eine zusätzliche Fehlerfortpflanzung (z.B. bei der Auswertung über das Flächen-

quadrat) des Meßwertes vorkommt. In der Praxis führt die Auswertung mit externem Standard auch bei der Bestimmung von Nebenkomponenten zu besseren Ergebnissen, da durch die Hauptkomponente die Basislinie der Remissionsgrad-Ortskurve oftmals so gestört sein kann, daß elektronische Integratoren nicht mehr einwandfrei arbeiten. Als Beispiel sei hier die Bestimmung des Zersetzungsproduktes 4-Methylaminophenazon in Metamizol-Lösungen (EBEL, ROST 1978) (s.a. Kap. 3.2.) angeführt. Auch die Bestimmung von Substanzen mit niedrigen Extinktionskoeffizienten wie z.B. Ephedrin in Hustensäften neben anderen Stickstoffbasen ist meist nach der Methode mit externem Standard genauer als bei Verwendung eines internen Standards.

3. Anwendung der DC-Direktauswertung

3.1. Stabilitätsuntersuchungen ohne gleichzeitige Erfassung der Abbauprodukte am Beispiel des Ephedrins

In der Regel gelten Ephedrin bzw. dessen Salze bei sachgemäßer Lagerung als relativ stabil [BÖHME , HARTKE 1968] . Dennoch sind bei überdurchschnittlichen Lagerzeiten, wie sie z.B. im Rahmen der Bevorratung für Notsituationen üblich sind, Abbauerscheinungen möglich. Nachgewiesen wurden solche Zersetzungen bislang entweder über eine Bestimmung des Restgehaltes an Ephedrin bzw. über den qualitativen Nachweis der Abbauprodukte mittels DC. Zur quantitativen Erfassung des Ephedrins eignen sich in diesem Falle die jodometrische Titration und polarographische Bestimmungsmethoden [EBEL 1977]. Titrationen, die auf der Bestimmung des basischen Stickstoffs oder des Anions beruhen, sind für diese Aufgabenstellung nicht anwendbar, da die Abbauprodukte dann quantitativ miterfaßt

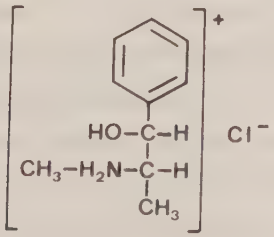


Abb. 11:
Ephedrin - HCl

würden. Auch bei kolorimetrischen Bestimmungen muß bedacht werden, ob die Zersetzungsprodukte stören können, was bei einer Bestimmung nach Wasserdampfdestillation (STEINIGER 1968) nicht auszuschließen ist. Wegen ihrer hohen Spezifität dürften chromatographische Verfahren am geeignetsten sein [MACEK 1972]. Nach der DC-Trennung und Elution läßt sich Ephedrin fluorimetrisch (DE POTTER 1958) bzw. kolorimetrisch als Cu-Komplex (VROMBAUT , THOMAS , COORMAN 1969), mit Pikrylchlorid (SARSUNOVA , CHI 1966) oder über eine Diazoreaktion (LANG 1971) bestimmen. Eine direkte Auswertung auf der Platte ohne Anfärbung wurde unseres Wissens bislang nicht beschrieben. Densitometrische Messungen von dc-getrenntem Ephedrin wurden von CHOULIS und CAREY (1958) nach Anfärben mit $FeCl_3/K_3[Fe(CN)_6]$ sowie von NONOURA und Mitarbeitern (1975) nach Anfärben mit Ninhydrin beschrieben. Die letztere Arbeit beschäftigt sich mit der Bestimmung von Ephedrin in Drogen. Eine fluorimetrische in situ-Bestimmung als Dansylderivat wurde von FREI , SANTI und THOMAS (1976) veröffentlicht.

3.1.1. Chromatographie

Für die Identifizierung von Ephedrin in Arzneimitteln sind in der Literatur eine ganze Reihe von Fließmitteln beschrieben worden. Im Hinblick auf die Direktauswertung konnten Fließmittel, die höhere Alkohole (wie z.B. n-Butanol) enthalten, nicht eingesetzt werden, da wegen der zu langen Entwicklungszeiten zu starke Diffusionsverbreiterungen der DC-Flecke eintreten. Neutrale Fließmittel scheiden ebenfalls aus, da meist

ein ausgeprägtes Tailing auftritt, oder in extremen Fällen sogar die Ausbildung von zwei Flecken beobachtet werden kann. Bei ammoniakhaltigen Fließmitteln ist darauf zu achten, daß der NH_3-Anteil so hoch gewählt wird, daß mit Sicherheit ß-Fronten vermieden werden. Aus demselben Grund sollte man auch nach Möglichkeit keine Mehrkomponentensysteme verwenden. Nach einer Reihe von Vorversuchen hat sich Acetonitril / 25% NH_3 (50 + 5,5 v/v) am besten bewährt.

3.1.2. Direkte Remissionsmessung

Ephedrin besitzt im Bereich von 250 bis 265 nm drei schwach ausgeprägte Absorptionsmaxima mit sehr niedrigem Extinktionskoeffizienten ($E^{1\%}_{1cm} \leq 12$). Für eine direkte Remissionsmessung sind deshalb relativ hohe Substanzmengen pro DC-Fleck erforderlich ($\geq 2\mu g/\mu l$/Fleck), um auswertbare Remissionsgrad-Ortskurven zu erhalten (EBEL , ROST 1979). In galenischen Zubereitungen mit Ephedrin als Monosubstanz ist eine solche Messung durchaus ausführbar. In Substanzgemischen führt dies jedoch zwangsläufig zu einer Erhöhung der mitaufgetragenen Mengen an Begleitsubstanzen und damit oft zu Überladungen der Flecke und somit zu Störungen der Chromatographie. Bei der Analyse öliger Nasentropfen ist die direkte Remissionsmessung nicht anwendbar, da die Hilfs- und Trägersubstanzen eine eindeutige Abtrennung des Ephedrins in dem in Frage kommenden Mengenbereich verhindern.

3.1.3. Anfärbung

Das in der Literatur oftmals angewendete Sprühen mit $KMnO_4$ [CLARKE 1969 ; STAHL 1967] ist zu unspezifisch, d.h. es treten keine gut auswertbaren Flecke auf nicht angefärbtem Untergrund auf. Das von CHOULIS und CAREY (1958) verwendete $FeCl_3/K_3[Fe(CN)_6]$ -Reagenz ist nicht empfindlich genug und führt außerdem zu schlecht reproduzierbaren Ergebnissen. Demgegenüber ergibt sich beim Sprühen mit Ninhydrin in der von MACEK [1972] angegebenen Modifikation (0,2% Ninhydrin in HAc/n-Butanol 5 + 95) eine sehr günstige Nachweis- und Erfassungsgrenze. Es ist allerdings zu beachten, daß Reste von Ammoniak aus dem Fließmittel stören. Die Vorbehandlung der Platten und der Sprühvorgang müssen sehr sorgfältig durchgeführt werden (vergl. Kap. 5.1.). Leider war es nicht möglich, das Lösungsmittel n-Butanol durch Lösungsmittel mit niedrigerer Viskosität und höherem Dampfdruck (wie z.B. Äther oder Methanol) zu ersetzen. Es trat ein viel zu schnelles Verblassen des gebildeten Farbstoffes auf. Trotz ausgedehnter Versuche gelang es außerdem nicht, das Sprühen durch Tauchen zu ersetzen. In beiden Fällen hätte man mit genaueren Ergebnissen rechnen können.

3.1.4. Auswertung über Eichfunktionen

Bei der direkten Remissionsmessung an Ephedrin ergab sich weder bei $F(c)$, $F^2(c)$, $h(c)$ noch $h^2(c)$ ein linearer Zusammenhang (vergl. Tab.1 und Abb.12). Vermutlich liegt dies an dem sehr geringen Extinktionskoeffizienten des Ephedrins.

Bei anderen Substanzen ist in diesem Mengenbereich im allgemeinen zumindest $F^2(c)$ linear. Wegen der relativen Überladung des DC-Flecks macht sich die bislang mathematisch nicht faßbare komplexe Mittelwertbildung anscheinend bemerkbar.
Nach Sprühen mit Ninhydrin zeigt $F^2(c)$ dann eine gute Linearität, wenn man im Bereich von 0,25 bis 1,0 µg Ephedrin arbeitet (vergl. Tab.2 und Abb.13). Weder h (c) noch h^2 (c) zeigen einen linearen Verlauf. Die Reaktion von Ephedrin mit Ninhydrin ist so empfindlich, daß die Erfassungsgrenze in der Größenordnung von etwa 50 ng/Fleck liegt. Erwartungsgemäß verhält sich im Substanzmengenbereich von 50 bis 250 ng/Fleck sowohl h (c) als auch F (c) linear (vergl. Tab.3 und Abb.14).

Menge/ Fleck	Höhe	Höhe²	Fläche	Fläche²
µg	cm	cm^2	cm^2	cm^4
1,014	2,635	6,94	2,201	4,84
2,028	4,49	20,16	3,684	13,57
3,042	5,525	30,53	5,085	25,86
4,056	7,455	55,56	6,705	44,96
5,07	8,28	68,56	7,875	62,02

Fläche = Peakhöhe * Halbwertsbreite

Auftragevolumen : jeweils 0,5 µl

Tab. 1 : Eichwerte bei direkter Remissionsmessung von Ephedrin-HCl

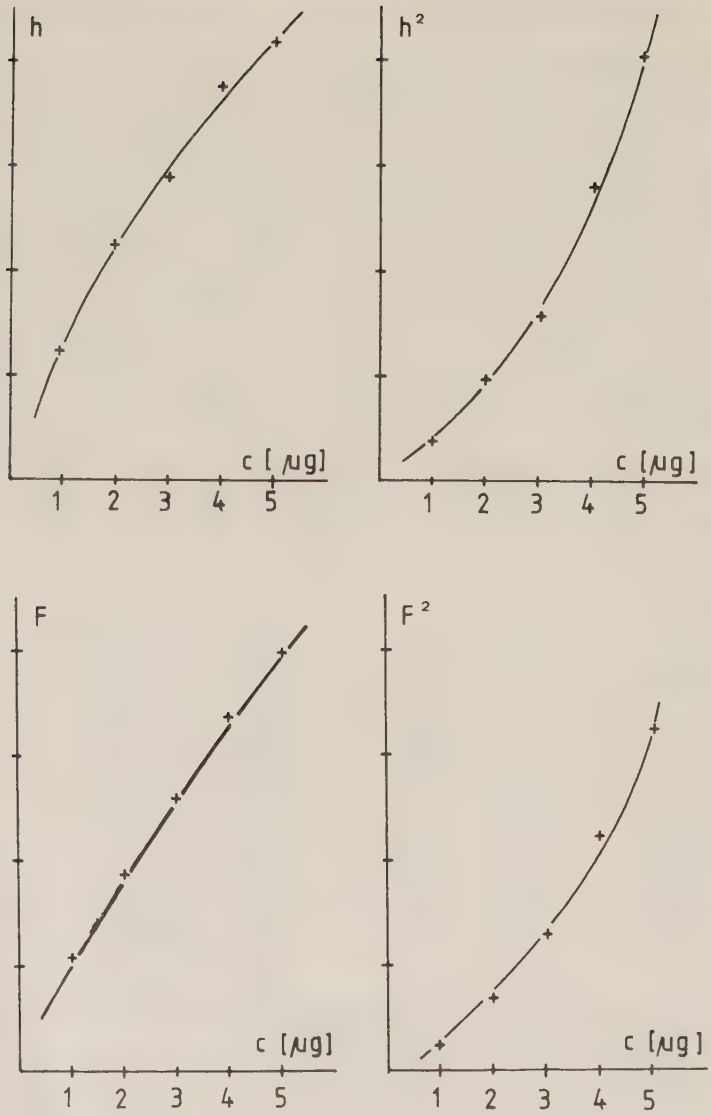


Abb. 12 : Eichfunktionen bei der direkten Remissionsmessung von Ephedrin- HCl

Menge/ Fleck	Höhe	Höhe²	Fläche	Fläche²
ng	cm	cm²	cm²	cm^4
254,5	8,38	70,22	3,98	15,85
509,0	11,9	141,61	6,26	39,16
772,0	13,58	184,28	7,83	61,23
1018,0	14,85	220,52	8,91	79,39

Auftragevolumen : jeweils 0,5 µl

Tab. 2 : Eichwerte der Remissionsmessung von Ephedrin-HCl nach Reaktion mit Ninhydrin (Substanzmenge : 250 bis 1000 ng/Fleck)

Menge/ Fleck	Höhe	Höhe²	Fläche	Fläche²
ng	cm	cm²	cm²	cm^4
51	2,95	8,7	1,49	2,2
102	4,58	20,93	2,12	4,5
153	7,33	53,66	3,4	11,58
204	9,0	81,0	4,2	17,64
255	11,05	122,1	5,53	30,53

Auftragevolumen : jeweils 0,5 µl

Tab. 3 : Eichwerte der Remissionsmessung von Ephedrin-HCl nach Reaktion mit Ninhydrin (Substanzmenge : 50 bis 250 ng/Fleck)

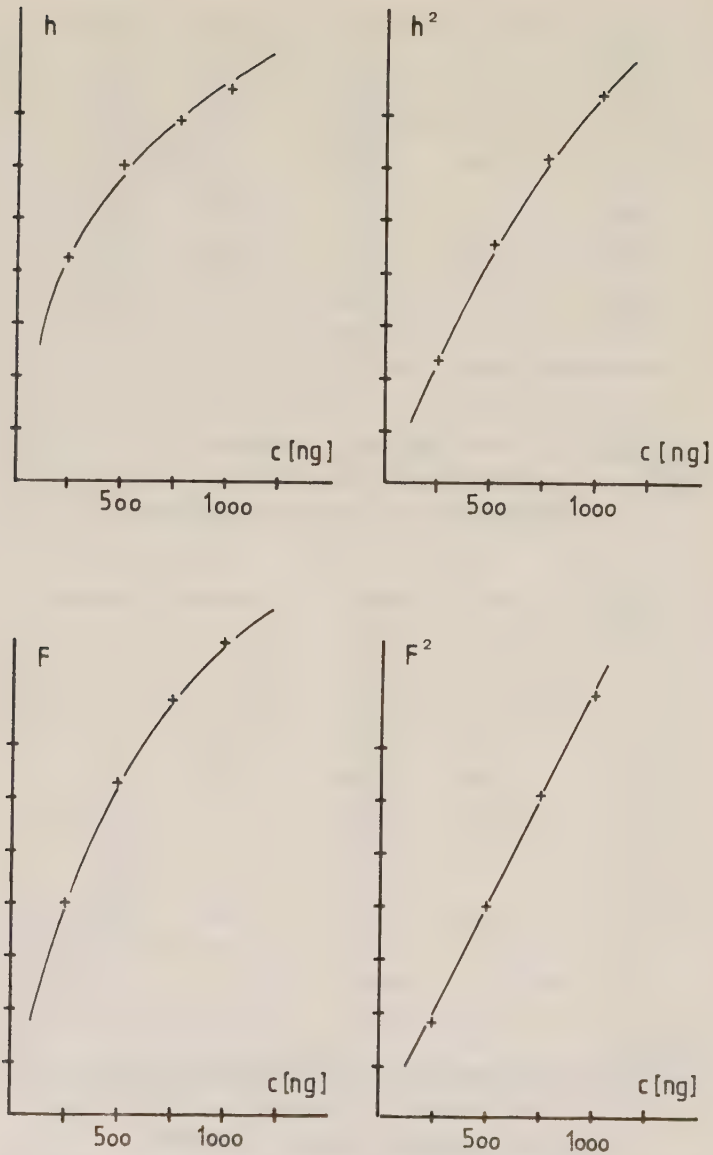


Abb. 13 : Eichfunktionen bei der Remissionsmessung von Ephedrin-HCl nach Reaktion mit Ninhydrin
(Substanzmenge 250 bis 1000 ng/Fleck)

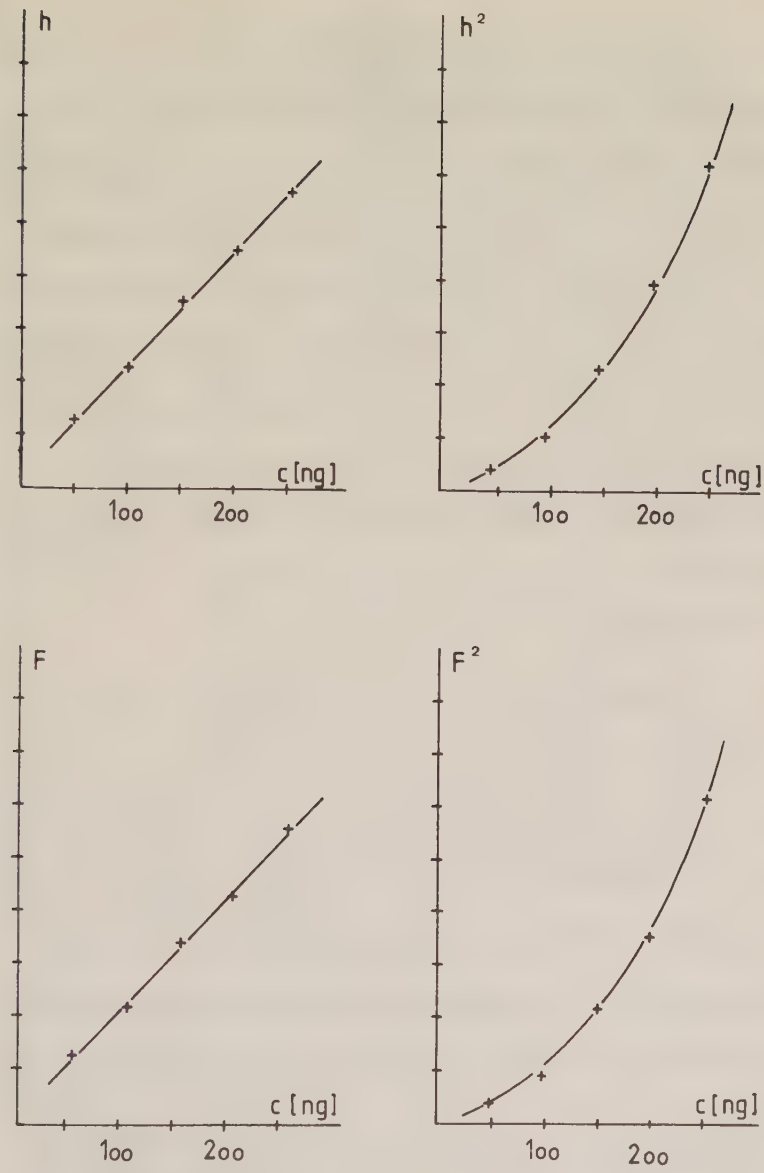


Abb. 14 : Eichfunktionen bei der Remissionsmessung von Ephedrin-HCl nach Reaktion mit Ninhydrin (Substanzmenge 50 bis 250 ng/Fleck)

3.1.5. Auswertung mit internem Standard

Arbeitet man bei der Auswertung mit der Methode des internen Standards (EBEL , HEROLD 1975a,1975b ; KLAUS 1965,1971), so läßt sich der Auftragefehler praktisch eliminieren (vergl. auch Kap. 2.2.4.). Bei der direkten Remissionsmessung erwies sich die Verwendung von Cornecain oder Paracetamol als geeignet, für die Auswertung nach Anfärben mit Ninhydrin diente Etilefrin als Standard. Die Methode des internen Standards wurde lediglich bei der vollautomatischen, rechnergesteuerten Auswertung (EBEL , HOCKE 1976,1977), nicht jedoch bei der manuellen Auswertung der registrierten Remissionsgrad-Ortskurve eingesetzt.

3.1.6. Ergebnisse

Es ist zu erwarten, daß eine Ephedrin-Bestimmung über eine Direktauswertung von Dünnschichtchromatogrammen mit relativ großen Fehlern behaftet sein muß. Bei der direkten Remissionsmessung muß mit Substanzmengen von 1 bis 3 µg/Fleck gearbeitet werden, d.h. bei Mengen, bei denen sich alle chromatographischen Parameter ungünstig auf die Fleckform auswirken. Demgegenüber kann man bei der Ninhydrin-Methode zwar im optimalen Mengenbereich arbeiten, doch kommen beim Anfärben eine ganze Reihe neuer Fehlerquellen hinzu. In den Tabellen 4 und 5 sind die wichtigsten Ergebnisse zusammengefaßt. Man erkennt deutlich, daß chromatographische Fehler und die Fehler beim Sprühen anscheinend den Hauptanteil zu der Unsicherheit der Ergebnisse beitragen,da praktisch alle Auswerteverfahren zu Fehlern in der gleichen Größenordnung führen.

Formulierung	Ephedrin Sollwert (mg)	Ephedrin gefunden (mg) 1)	σ rel (%)	(n)	Meßgröße/ Auswertung 3)
Lösung der Reinsubstanz	100,0	101,8	2,90	(10)	h,i
	100,0	99,9	3,27	(8)	h,i
	100,0	101,4	2,39	(8)	h,i,r
	100,0	99,8	4,07	(11)	b * h,i
Ephedrin Tbl Knoll^{R}	50,0 2)	44,5	2,00	(4)	h,e,r
	50,0	49,4	4,11	(4)	h,e
	50,0	49,9	3,53	(4)	b * h,e
	50,0	47,5	3,33	(4)	b * h,e
EM-1 Saft^{R} Febena	330,0	330,7	6.8	(21)	b * h,e
	330,0	343,5	3,69	(20)	h,e,r
	330,0 2)	329,5	4,07	(11)	h,i
	330,0 2)	330,9	3,20	(10)	h,i,r
	330,0	330,8	3,61	(11)	h,i

Tab. 4 : Quantitative in situ-Bestimmung von Ephedrin durch direkte Messung der Remission

1) 100 mg in der Reinsubstanz-Lösung (1 proz., Auftragevolumen 3,0 µl) ≙ 3,0 µg/Fleck

50,0 mg Ephedrin-HCl in den Tabletten ≙ 2,63 µg/Fleck

330,0 mg Ephedrin-HCl im Saft ≙ 3,3 µg/Fleck

2) aus Lagerversuchen bei 41° bzw 50°C

3) h Meßgröße Peakhöhe

b*h Meßgröße Fläche ,berechnet aus Peakhöhe*Halbwertsbreite

i interner Standard

e externer Standard

r Messung und Auswertung vollautomatisch,rechnergesteuert

Formulierung	Ephedrin Sollwert (mg)	Ephedrin gefunden (mg) 1)	σ rel (%)	(n)	Meßgröße Auswertung 3)
Ephedrin Tbl Knoll^{R}	50,0	47,84	4,14	(16)	h,e
	50,0	49,00	3,88	(32)	h,e
	50,0	49,00	3,24	(8)	h,e
	50,0	46,81	3,78	(16)	b * h,e
	50,0	49,4	4,62	(32)	b * h,e
	50,0	49,66	4,90	(8)	b * h,e
EM-1 Saft^{R} Febena	330.0	317,3	4.87	(24)	h,e
	330,0	316,7	5,80	(24)	b * h,e
Endrine^{R} Nasentropfen	750,0	721,8	5,43	(24)	h,e
	750,0	732,2	6,o5	(24)	h,e
	750,0	746,1	6,55	(24)	b * h,e
	750,0	744,2	6,92	(24)	b * h,e

Tab. 5 : *Quantitative in situ-Bestimmung von Ephedrin nach Reaktion mit Ninhydrin*

1) 50,0 mg Ephedrin-HCl in den Tabletten ≙ 0,13 µg/Fleck

330,0 mg Ephedrin-HCl im Saft ≙ 0,2 µg/Fleck

750,0 mg Ephedrin-HCl in den Nasentropfen ≙ 0,2 µg/Fleck

3) Zeichenerklärung siehe Tab.4

3.2. Stabilitätsuntersuchungen bei gleichzeitiger quantitativer Erfassung eines Abbauproduktes am Beispiel des Metamizols

Metamizol (Noramidopyrinmethansulfonat; Novalgin^{R}) zersetzt sich in wäßriger Lösung unter Abspaltung von Formaldehyd und Bisulfit zu 4-Methylaminophenazon (AWE , TRACHT 1963). Praktisch alle Verfahren zur Bestimmung des Metamizols (vergl. EBEL [1977]) erfassen Formaldehyd, Sulfit oder das Pyrazolin-Ringsystem, d.h. das Hydrolyseprodukt wird genauso erfaßt wie die unveränderte Ausgangssubstanz. PECHTOLD (1964) bestimmte

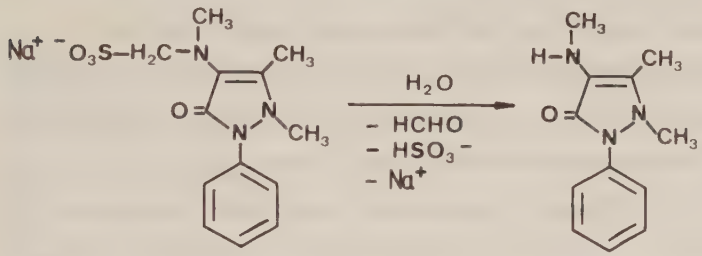


Abb. 15 : Zersetzungsablauf des Metamizols

deshalb den Hydrolysegrad durch säulenchromatographische Abtrennung und Isolierung des 4-Methylaminophenazons mit anschließender fotometrischer Messung im ultravioletten Spektralbereich. KROSS , KRÖTSCH und TRAPMANN (1975) verwendeten ebenfalls die fotometrische Messung, trennten jedoch das Zersetzungsprodukt dünnschichtchromatographisch ab. Die Elution aus dem ausgekratzten Kieselgel wurde mit Methanol durchgeführt. ALTINKURT (1976) trennte ebenfalls durch DC, bestimmte jedoch das Metamizol kolorimetrisch mit 1,2-Naphtochinon-4-sulfonat nach Elution. Problematisch ist in den genannten

Fällen jedoch der Elutionsschritt, da die Elution aus Kieselgel nur in wenigen Fällen quantitativ verläuft. Die direkte Bestimmung beider Komponenten über Remissionsmessung auf der DC-Platte bot sich daher als Alternative an (EBEL,ROST 1978).

3.2.1. Chromatographie

Für die dünnschichtchromatographische Trennung von 4-Methylaminophenazon und Metamizol eignet sich das Fließmittel Benzol / Aceton / 95% Äthanol (1 : 1 : 1 v/v) (KROSS,KRÖTSCH, TRAPMANN 1975). Die resultierende Fleckform ist sehr günstig für eine Direktauswertung, sofern man auf eine nicht zu große Trennstrecke achtet, da die Gefahr der Ausbildung einer ß-Front wegen des geringen Gehaltes der polarsten Komponente Wasser besteht, die ein Verziehen der DC-Flecke bewirkt. Eine Erhöhung des Gehaltes an Wasser im Fließmittel, d.h. die Verwendung von z.B. Benzol / Aceton / 95% Äthanol / Wasser (35 : 33 : 26 : 11 v/v) (PAULUS 1974), bewirkt keine zusätzliche Zersetzung des Metamizols. Im Hinblick auf die Verwendung von zwei verschiedenen Substanzen als interner Standard ergeben sich bei diesem Fließmittel Vorteile. Die Trennstrecke wurde jedoch auch hier auf 6 cm begrenzt.

3.2.2. Auftragetechnik

In Reihenversuchen wurde festgestellt, daß die Zersetzung des Metamizols auch in Methanol als Lösungsmittel abläuft. Es ist deshalb darauf zu achten, daß alle Operationen möglichst schnell ausgeführt werden. Das Auftragen der Analysen- bzw. Eichlösungen erfolgt deshalb unmittelbar nach dem Lösen mit

0,5 µl Mikropipetten. Aus dem gleichen Grunde sollte die Platte nach dem Auftragen nur kurz an der Luft getrocknet werden. Zur Kontrolle der eigenen Arbeitstechnik sollte weiterhin immer ein Fleck mit Metamizol mit aufgetragen werden. Da reines Metamizol in Festsubstanz praktisch kein 4-Methylaminophenazon enthält, ist die Menge des auf dieser Bahn gefundenen Zersetzungsproduktes unmittelbar von der angewendeten Arbeitstechnik abhängig. Bei Nichtbeachtung der obigen Arbeitsanweisung konnten Zersetzungen bis zu 12% beobachtet werden.

3.2.3. Auswertung über Eichkurven

Metamizol wird üblicherweise als 50proz.wäßrige Lösung für Injektionszwecke verwendet; die Menge des Zersetzungsproduktes liegt unter 5% des Gesamtgehaltes. Es sollte sowohl das unzersetzte Metamizol wie auch das Hydrolyseprodukt direkt auf der selben Platte bestimmt werden. Verdünnt man 2,50 ml Ampullenlösung mit Methanol p.a. auf 200,0 ml, so enthalten 0,5 µl Lösung ca 3,0 µg Metamizol und ca. 100,0 ng 4-Methylaminophenazon. Die betreffenden Eichkurven sollten folglich im Bereich von 1 bis 5 µg Metamizol bzw. 20 bis 150 ng 4-Methylaminophenazon aufgenommen werden. In diesen Mengenbereichen ergeben sich beim Metamizol eine lineare Abhängigkeit des Quadrats der Fläche der Remissionsgrad-Ortskurve (TAUSCH 1971) bzw. des Quadrates der Peakhöhe [KUSSMAUL 1972] von der Konzentration (Tab.6 und Abb.16). Andererseits arbeitet man bei dem Hydrolyseprodukt im Bereich der linearen Abhängigkeit des Meßsignals (Fläche bzw. Peakhöhe) von der Auftragemenge [KUSSMAUL 1972](BETHKE,FREI 1974;EBEL,HEROLD,HOCKT 1976b) (Tab.7 und Abb.17).

Menge/ Fleck	Höhe	Höhe²	Fläche	Fläche²
µg	cm	cm²	cm²	cm⁴
0,508	4,63	21,4369	2,037	4,1502
1,0172	7,27	52,8529	3,7804	14,2914
2,0344	9,86	97,2196	5,7188	32,7047
3,0516	11,67	136,1889	6,5352	42,7088
5,086	14,21	201,9241	7,9576	63,3234
Auftragevolumen : jeweils 0,5 µl				

Tab. 6 : *Eichwerte zur quantitativen Bestimmung von Metamizol durch Remissionsmessung*

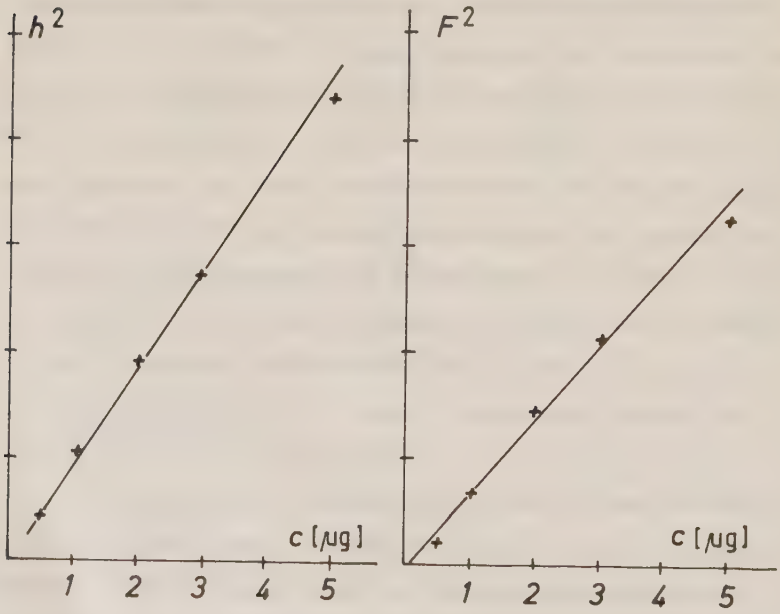


Abb. 16 : *Eichkurven zur quantitativen Bestimmung von Metamizol (h^2, F^2)*

Menge/ Fleck	Höhe	Höhe²	Fläche	Fläche²
ng	cm	cm²	cm²	cm⁴
48	2,97	8,82	1,31	1,708
74	4,68	21,90	1,92	3,682
96	5,86	34,34	2,52	6,349
148	9,92	98,41	4,46	19,927

Auftragevolumen : jeweils 0,5 µl

Tab. 7 : *Eichwerte zur quantitativen Bestimmung von 4-Methylaminophenazon durch Remissionsmessung*

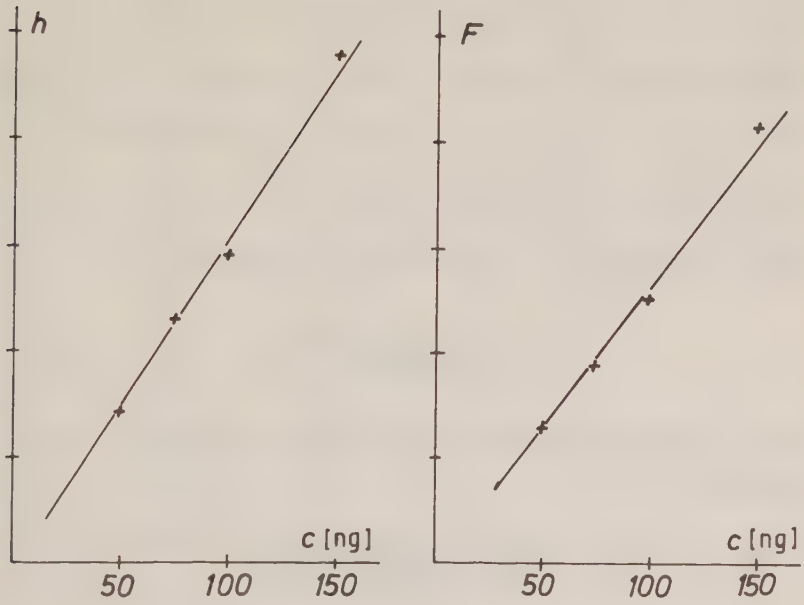


Abb. 17 : *Eichkurven zur quantitativen Bestimmung von 4-Methylaminophenazon (h , F)*

3.2.4. Auswertung mit internem Standard

Entsprechend den im fehlertheoretischen Teil gemachten Ausführungen über die Verwendung eines internen Standards müssen im vorliegenden Falle zwei verschiedene Substanzen als interner Standard eingesetzt werden: Chloramphenicol zur Bestimmung des Metamizols und Nicotinsäureamid zur Bestimmung des 4-Methylaminophenazons. Bei der Auswertung mit Hilfe des internen Standards kann in jedem Fall die Fläche bzw. die Peakhöhe als Meßgröße eingesetzt werden.

3.2.5. Ergebnisse

Tabelle 8 enthält die Ergebnisse der Untersuchung von Novalgin^R-Ampullen mit unterschiedlicher Lagerzeit. Angegeben ist der gefundene Gehalt an Novalgin^R, Hydrolyseprodukt und der daraus resultierende ursprüngliche Gesamtgehalt. Darüberhinaus ist der prozentuale Hydrolysegrad mit angeführt.
Der prozentuale Hydrolysegrad H ergibt sich aus den bestimmten Mengen an Metamizol c_M und 4-Methylaminophenazon c_H zu

$$H = \frac{1.618 \times C_H}{C_M + 1.618 \times C_H} \times 100 \qquad (39),$$

der auf Metamizol bezogene prozentuale Gehalt des Hydrolyseproduktes P zu

$$P = \frac{C_H}{C_M + 1.618 \times C_H} \times 100 \qquad (40).$$

Der Faktor 1,618 resultiert aus dem Verhältnis der betreffenden Molekulargewichte.

Charge/ Probe-nummer	Metamizol mg/ml	4-Methylamino-phenazon mg/ml	Metamizol (ursprünglich) mg/ml	Hydrolyse-grad %
A 3	487,7	12,1	507,3	3,9
B 21	488,3	13,4	510,0	4,3
16	492,5	10,9	510,2	3,5
14	505,1	11,3	523,4	3,5
11	485,1	12,4	505,2	4,0
4	480,1	11,6	498,9	3,8
C 17	494,3	11,4	512,2	3,6
5	489,3	11,7	508,2	3,7
D 6	480,0	12,5	500,1	4,0
E 25	497,7	11,3	515,9	3,5
F 2	497,5	12,2	516,8	3,8
8	496,9	11,9	516,1	3,7
23	495,6	12,0	514,2	3,8
28	501,1	11,3	519,5	3,5
G 9	507,4	12,0	526,0	3,7
H 10	495,0	12,0	514,4	3,8
20	500,9	11,1	518,8	3,5
I 12	489,6	12.3	509,4	3.9
19	495,8	11,3	514,1	3,6
22	497,0	12,7	517,6	4,0
26	509,0	11,4	527,5	3,5
K 7	476,0	11,8	495,1	3,9
13	499,3	11,9	518,4	3,7
15	499,4	11,3	517,7	3,5
18	489,5	11,2	503,7	3,6
24	492,1	11,5	511,1	3,5
27	488,5	10,9	506,2	3,5
L 1	489,9	12,7	510,6	4,1

Tab. 8 : Quantitative Bestimmung der Zersetzung von Metamizol

Sind bei einer Charge mehrere Probennummern angegeben, so handelt es sich hierbei um verschiedene Lagerbestände derselben Charge, die unter Umständen jedoch verschiedenen Lagerbedingungen unterworfen gewesen sein können. Alle Einzelangaben stellen Mittelwerte aus mindestens 12, in den meisten Fällen 20 Einzelbestimmungen dar.

Die durchschnittliche gefundene relative Standardabweichung der angegebenen Daten beträgt bei der Bestimmung des Metamizols 2,42% (Auswertung Peakhöhe), 3,83% (Auswertung Peakhöhe* Halbwertsbreite) bzw. 2,0% (rechnergesteuerte Auswertung Peakhöhe). Die entsprechenden Werte für das 4-Methylaminophenazon liegen bei 7,87% , 10,38% bzw. 4,80%.

Vergleicht man die Mittelwerte aller gefundenen Ergebnisse aller Chargen (vergl. Tab. 9), so ergibt sich der interessante Befund, daß der Gehalt an 4-Methylaminophenazon annähernd konstant ist, d.h. von der Lagerdauer anscheinend unabhängig ist.Hieraus könnte man den Schluß ziehen, daß die Hydrolyse praktisch nur während des Sterilisationsprozesses eintritt bzw. bei Zimmertemperatur zu langsam verläuft.

Charge	Alter Jahre	Metamizol mg/ml	4-Methylamino-phenazon mg/ml	Hydrolysegrad %
A	5	487,7	12,1	3,61
B	4	490,2	11,9	3,79
C	4	491,8	11,5	3,67
D	4	480,0	12,5	4,01
E	3	497,7	11,3	3,54
F	3	497,5	11,8	3,72
G	3	507,4	12,0	3,69
H	3	497,9	11,5	3,62
I	2	497,9	11,9	3,74
K	1	490,8	11,4	3,61
L	1	489,9	12,7	4,07

Tab. 9 : Abhängigkeit der Zersetzung von der Lagerdauer

Das angegebene Verfahren ist - unter Umständen mit leichten Modifikationen des chromatographischen Trennprozesses - auch für die Bestimmung von Metamizol in Kombinationspräparaten anwendbar. Es ist jedoch nicht ohne weiteres möglich, Metamizol-Calcium bzw. Metamizol-Chinin auf dieselbe Weise zu bestimmen, da in Gegenwart von Calcium vermutlich wegen Komplexbildung Fleckdeformationen und in Gegenwart von Chinin ein starkes Tailing auftreten. Letzteres läßt sich jedoch durch eine Verminderung des Wasseranteils im Fließmittel auf 2,5 Teile (v/v) vermeiden.

3.3. Stabilitätsuntersuchungen bei gleichzeitiger quantitativer Erfassung herstellungsbedingter Nebenprodukte am Beispiel des Codeins

Da die in Rohopium vorkommenden Codeinmengen (zwischen 0,5 und 3,5%) den Bedarf an dieser Substanz keineswegs decken, wird der größte Teil halbsynthetisch durch Methylieren aus Morphium hergestellt [BÖHME , HARTKE 1976]. Während früher zu diesem Zweck Dimethylsulfat in alkalischer Lösung verwandt wurde [BÖHME , HARTKE 1968], wird heute in der Regel mit Phenyltrimethylammoniumchlorid in methanolischer Lauge

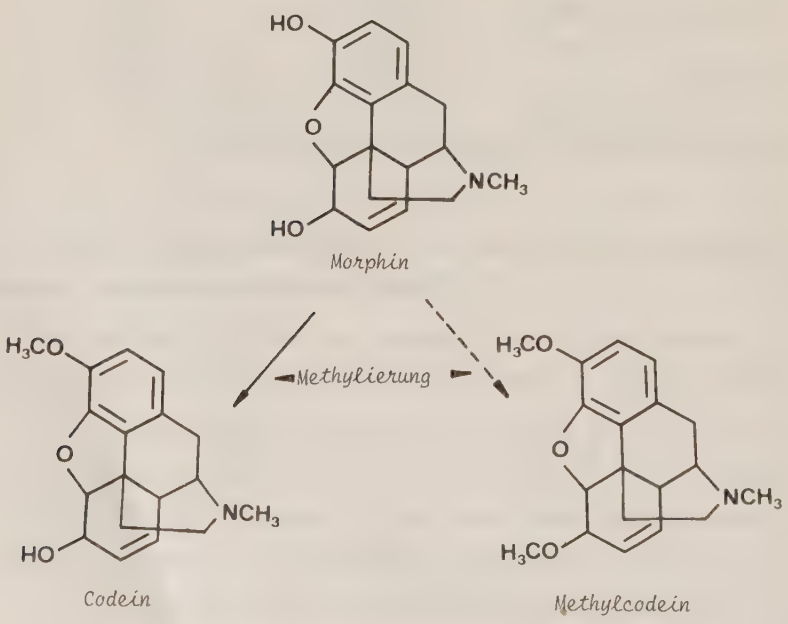


Abb. 18 : Methylierungsprodukte des Morphins

unter Druck umgesetzt [BÖHME , HARTKE 1976], da bei den üblichen Alkylierungsreagenzien stets quartäre Nebenprodukte auftreten. Erscheint das n-methylierte quartäre Salz des Codeins nur bei ungünstigen Methylierungsbedingungen, so scheint Methylcodein als Nebenprodukt unvermeidbar zu sein und läßt sich in der Regel nachweisen (C.H.BOEHRINGER 1976).
Untersuchungen über die Reinheit der Hauptalkaloide des Opiums wurden bereits von zahlreichen Autoren durchgeführt; die Verunreinigung des Codeins durch Methylcodein wird dabei jedoch kaum erwähnt. PFEIFFER (1963) berichtet in diesem Zusammenhang über eine Nachweismethode, bei der Methylcodein bis zu einem Gehalt von o,5% papierchromatographisch erfaßt wird. Über den dünnschichtchromatographischen Nachweis des Methylcodeins berichten EICHHORN und KNY (1973).
Da es in der Stabilitätsanalytik mitunter von Bedeutung sein kann, auch herstellungsbedingte Nebenprodukte quantitativ zu erfassen, um bei längerer Lagerung auch deren Verhalten zu kontrollieren, soll im Zusammenhang dieser Arbeit über eine direkte Bestimmung beider Substanzen auf der DC-Platte berichtet werden.
Die Methode der in situ-Remissionsmessung zur Bestimmung von Codein wurde bereits von EICH u.a. (1969) sowie SCHLEMMER und KAMMERL (1973) angewandt. Auch ROEDER, EICH und MUTSCHLER (1971) bedienen sich dieser Methode bei der Untersuchung von Opiumalkaloiden.
In den gültigen Arzneibüchern wird dem Vorhandensein von Methylcodein neben Codein relativ wenig Bedeutung beigemessen. Pharm.Helv. VI und das Arzneibuch der DDR lassen eine quali-

tative DC durchführen; das Europäische Arzneibuch verlangt neben der Prüfung auf nicht umgesetztes Morphin lediglich eine Untersuchung auf andere Nebenalkaloide, die eine Reaktion mit Schwefelsäure ergeben. Eine ausdrückliche Prüfung auf Methylcodein wird nicht vorgeschrieben, wenngleich - so der Kommentar [BÖHME , HARTKE 1976] - sie wünschenswert wäre.

3.3.1. Chromatographie

Für die dünnschichtchromatographische Trennung von Codein und Methylcodein eignet sich das Fließmittel Benzol / Aceton / Äthanol 70% / NH_3 25% (35 : 32,5 : 35 : 2,5 v/v).Nach zahlreichen Vorversuchen zeigte diese Mischung die deutlichste Trennung der beiden Substanzen, bei einer für die in situ-Remissionsmessung günstigen Fleckform. Bei einer Begrenzung der Laufstrecke auf 9 cm erreicht Codeinphosphat einen Rf-Bereich um 0,4, Methylcodein um 0,67. Obwohl dieses Fließmittel als Vierkomponentengemisch theoretisch als äußerst kritisch eingestuft werden müßte, hat es sich in der Praxis sowohl in der Eingangsuntersuchung (Güteprüfung) als auch bei der Untersuchung gelagerter, alkaloidhaltiger Arzneimittel seit einigen Jahren bewährt.

3.3.2. Auswertung

Zur Auswertung der DC-Platten stand auch hier ein Spektralfotodensitometer der Firma Kratos-Schoeffel Instruments zur Verfügung. Die Meßergebnisse der beiden Photomultiplier von Vergleichs- und Meßbahn werden bei diesem Gerät elektronisch gegeneinander ausgeglichen (SCHOEFFEL). Dabei wird in der Re-

gel das logarithmische Reflexionsverhältnis = $\lg \frac{R}{P}$ auf den Schreiber übertragen. Durch Übertragung des linearen Reflexionsverhältnisses = $\frac{P}{R}$ ist es möglich, die Empfindlichkeit des Gerätes erheblich zu steigern, sodaß es erreicht werden kann, auch noch Substanzmengen zu messen, die bei der üblichen Meßanordnung außerhalb der Nachweisgrenze lägen. Von dieser Möglichkeit der geänderten elektronischen Aufbereitung des Meßsignals wird bei der Auswertung des Methylcodeins Gebrauch gemacht, da sich bei Vorversuchen herausstellte, daß der Gehalt an Methylcodein sehr niedrig anzusetzen ist. Extrahiert man 30 mg Codeinphosphat enthaltende Tablettenmasse (fein gemörsert) mit 2 ml Wasser und zentrifugiert, so enthalten 2 µl des Zentrifugats 30 µg Codeinphosphat und etwa 70 ng Methylcodein. Die betreffenden Eichkurven sollten deshalb im Bereich 10 bis 50 µg Codeinphosphat bzw. 20 bis 100 ng Methylcodein liegen. In diesen Mengenbereichen ergibt sich für Codeinphosphat eine lineare Abhängigkeit des Quadrates der Peakhöhe sowie der Peakfläche von der aufgetragenen Substanzmenge (Tab.10 und Abb.19). Andererseits arbeitet man bei Methylcodein im Bereich der linearen Abhängigkeit des Meßsignals (Fläche bzw. Peakhöhe) von der Auftragemenge (Tab.11 und Abb.20). Ist man lediglich an einer quantitativen Bestimmung des Codeingehaltes ohne Berücksichtigung des Methylcodeins interessiert, so empfiehlt es sich, die eingesetzte Menge so zu wählen, daß die Eichgerade in einen Bereich von 150 bis 250 ng fällt, da hier auch für Codein eine lineare Abhängigkeit des Meßsignals von der Auftragemenge vorliegt. (Tab. 12 und Abb. 21).

Menge/ Fleck	Höhe	Höhe²	Fläche	Fläche²
µg	cm	cm²	cm²	cm⁴
10	8,96	80,28	7,974	63,58
20	12,4	153,76	13,64	186,05
30	14,85	220,52	17,82	317,55
40	16,48	271,59	20,765	431,19
50	17,9	294,99	23,81	566,92
Auftragevolumen : jeweils 2,0 µl				

Tab. 10 : *Eichwerte zur quantitativen Bestimmung von Codeinphosphat durch Remissionsmessung*

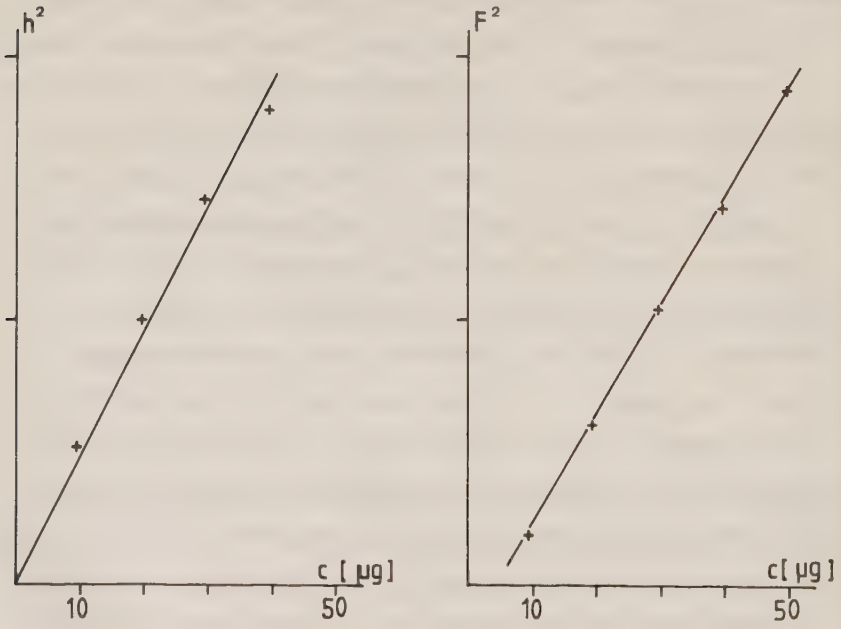


Abb. 19 : *Eichgeraden zur quantitativen Bestimmung von Codeinphosphat*

Menge/ Fleck	Höhe	Höhe²	Fläche	Fläche²
ng	cm	cm²	cm²	cm^4
20	1,92	3,69	1,23	1,51
40	3,40	11,56	2,35	5,50
60	4,95	24,50	2,97	8,82
80	6,95	48,30	4,17	17,39
100	8,14	66,26	5,13	26,30
Auftragevolumen : jeweils 2,0 µl				

Tab. 11 : Eichwerte zur Bestimmung von Methylcodein

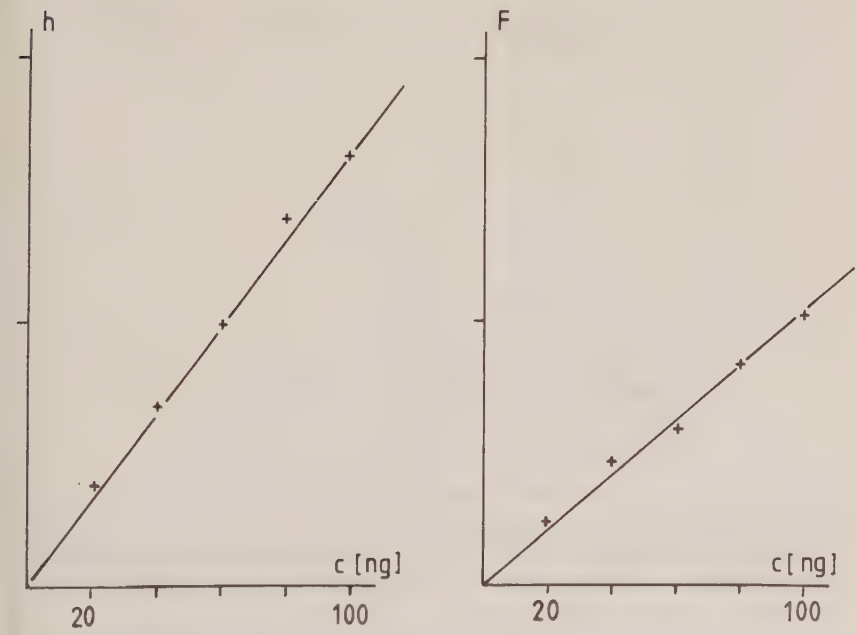


Abb. 20 : Eichfunktionen zur Bestimmung von Methylcodein (h , F)

Menge/ Fleck	Höhe	Höhe²	Fläche	Fläche²
ng	cm	cm²	cm²	cm⁴
100	1,0	1,0	1,0	1,0
150	1,35	1,82	1,49	2,21
200	1,65	2,7	1,82	3,29
250	2,3	5,3	2,3	5,3
Auftragevolumen : jeweils 0,5 µl				

Tab. 12 : *Eichwerte zur quantitativen Bestimmung von Codeinphosphat (Substanzmengenbereich 100 bis 250 ng/Fleck)*

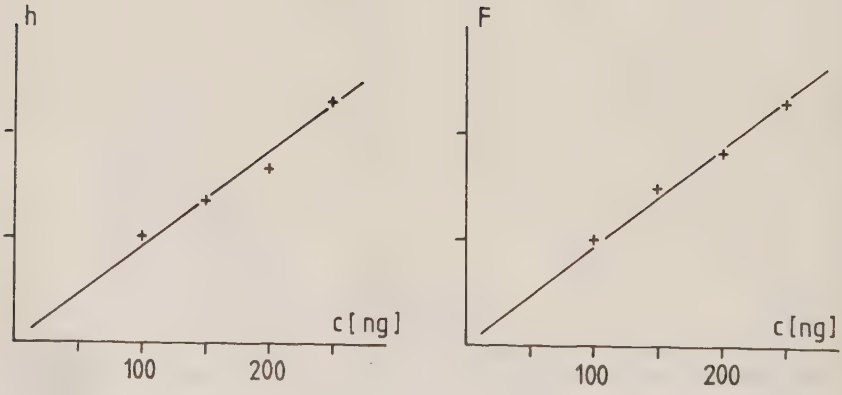


Abb. 21 : *Eichgeraden zur quantitativen Bestimmung von Codeinphosphat (Substanzmengenbereich 100 - 250 ng/Fleck)*

3.3.3. Ergebnisse

Die nachfolgende Tabelle enthält die Ergebnisse der Untersuchung von vier verschiedenen Chargen "Codeinphosphat 0,03 g Tabletten " unterschiedlicher Hersteller und Lagerdauer. Angegeben ist der gefundene Gehalt an Codeinphosphat und Methylcodein sowie der prozentuale Anteil an Methylcodein, berechnet auf den Gehalt an Codeinphosphat.
Alle angegebenen Werte stellen Mittelwerte aus 12 Einzelbestimmungen dar. Der Gehalt an Methylcodein in frischer Codeinphosphat-Reinsubstanz betrug im Mittel 0,25%.

Probe	Codeinphosphat mg/Tbl	Methylcodein mg/Tbl	proz.Anteil %
A	27,99	0,105	0,375
B	27,33	0,067	0,245
C	29,27	0,098	0,335
D	26,78	0,098	0,366
		MW :	0,330

Tab. 13 : Quantitative Bestimmung von Codeinphosphat und Methylcodein durch in situ-Remissionsmessung

Da bei den untersuchten Proben die Lagerdauer nur geringfügig voneinander abwich, wurden zur Überprüfung, ob durch längere Lagerung unter ungünstigen Bedingungen Veränderungen im Codeinphosphat- oder Methylcodeingehalt auftreten, je Charge 5 Tabletten 21 Tage lang bei 40° C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80 bis 90% aufbewahrt. Obwohl die Tabletten unverpackt waren, zeigten sich außer einer geringfügigen

Änderung der Tablettenoberfläche keinerlei Abweichungen zu den zuvor untersuchten Tabletten. Eine Verschiebung im Verhältnis Codeinphosphat/Methylcodein trat erwartungsgemäß nicht ein, zusätzliche Zersetzungsprodukte waren auch nach Detektion mit Dragendorffs Reagenz nicht nachweisbar.
Die durchschnittliche gefundene relative genäherte Standardabweichung der angegebenen Daten beträgt bei der Bestimmung des Codeins etwa 2,4 % (unabhängig von der Auswertemethode), für Methylcodein 7,9 % (Auswertung über Peakhöhe * Halbwertsbreite) bzw. 9,4 % (Auswertung über die Peakhöhe). Bei Anwendung der Data-Pair-Methode (BETHKE,SANTI,FREI 1974) läßt sich die Standardabweichung für Methylcodein bei beiden Auswertemethoden auf 6,0 % verbessern, da der fließmittelbedingte Randeffekt hierdurch teilweise aufgehoben wird.
Die beschriebene Methode eignet sich sowohl zur Überprüfung von Codein und Codeinsalzen in Reinsubstanz als auch von codeinhaltigen Zubereitungen. Bei Kombinationspräparaten ist es unter Umständen notwendig, Begleitsubstanzen vor der Bestimmung des Codeins abzutrennen und die Mengenverhältnisse in der Untersuchungslösung zu ändern. Eine weitere Verbesserung der relativen Standardabweichung kann nach den allgemeinen Erfahrungen durch automatisierte Integration der Remissionsgrad-Ortskurven erreicht werden, da die unruhige Basislinie, insbesondere bei der Bestimmung des Methylcodeins, die manuelle Auswertung erheblich stören kann.
Andere Nebenprodukte des Codeins können in den eingesetzten Mengenverhältnissen nicht nachgewiesen werden.

3.4. Stabilitätsuntersuchungen bei gleichzeitiger quantitativer Erfassung herstellungsbedingter Nebenprodukte und lagerungsbedingter Abbauprodukte am Beispiel von Morphinhydrochlorid

Morphin, in den Jahren 1803 bis 1806 erstmals von Sertürner aus Opium isoliert, hat bis heute eine große Bedeutung in der Medizin behalten. Indiziert bei allen schmerzhaften Zuständen, bei denen mit anderen schmerzstillenden Mitteln nicht auszukommen ist, insbesondere bei Wundschmerz und zur Operationsvorbereitung, wird Morphin auch in größeren Mengen für den Verteidigungvorrat der Streitkräfte sowie des Zivilschutzes eingelagert. Routinemäßige Untersuchungen dieser Bestände sind zu Beginn als auch im Verlauf der Lagerung unabdingbar. Zum einen soll dadurch im Rahmen der Arzneimittelsicherheit der Verbraucher vor Schäden durch verdorbene Arzneimittel geschützt werden, zum anderen soll jedoch auch der Staat vor Vermögensschäden durch Überlagerungen bewahrt werden.
Neben der Bestimmung des eigentlichen Morphingehaltes interessiert bei diesen Untersuchungen auch das Vorhandensein herstellungsbedingter Nebenprodukte und lagerungsbedingter Abbauprodukte sowie deren quantitative Erfassung. Es versteht sich daher von selbst, daß bereits zum frühest möglichen Zeitpunkt mit haltbarkeitsspezifischen Untersuchungsmethoden gearbeitet werden muß. Auf Grund des Herstellungsprozesses [ULLMANN´S ENZYKLOPÄDIE 1953] kann Morphin (I) Spuren der anderen Opiumalkaloide enthalten. Da Codein (II) von diesen mengenmäßig den größten Teil ausmacht und auch chemisch dem Morphin am

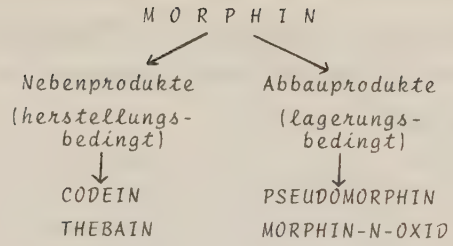
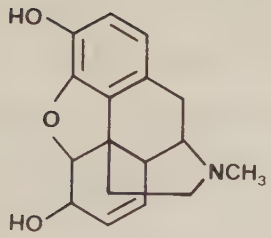


Abb. 22 : Neben- und Abbauprodukte des Morphins

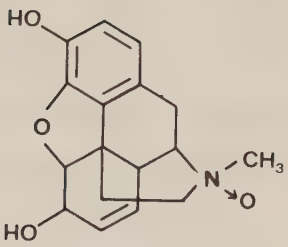
ähnlichsten ist, läßt sich in der Regel nur dieses als Nebenprodukt nachweisen. In länger gelagerter Morphin-Substanz können als Abbauprodukte Morphin-N-oxid (III) und Pseudomorphin (IV) auftreten (BOEHRINGER 1976). Von den anderen Opiumalkaloiden war für die vorliegende Arbeit nur noch Thebain (V) von Interesse.

Um die Bildung von Pseudomorphin (2,2´-Dehydrodimorphin) bei der Herstellung von Injektionslösungen zu verhindern, wird in einigen Fällen Sulfit als Stabilisator zugesetzt. Dieses Vorgehen ist jedoch mehr als problematisch, da in diesem Falle Morphinsulfonsäuren auftreten, über deren Toxizität bzw. Pharmakologie nur sehr wenig bekannt ist. Die Stabilität von Morphin-Lösungen war bereits mehrfach Thema wissenschaftlicher Arbeiten. Erwähnt seien hier nur die Arbeiten von YEH und LACH (1961), HAMMERSTINGL und TRAPMANN (1975) sowie LANG und REICH (1969).

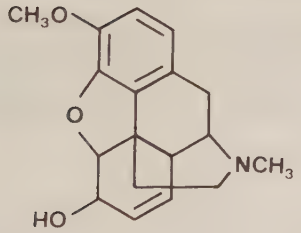
Auch die Analytik des Morphins wird in der Literatur ausführlich behandelt. Neben zahlreichen anderen Untersuchungsmethoden zitiert EBEL [1977] bereits Autoren, die eine quantitative



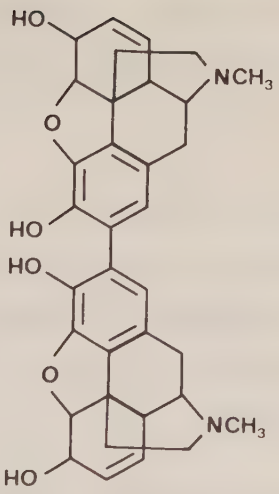
(I)



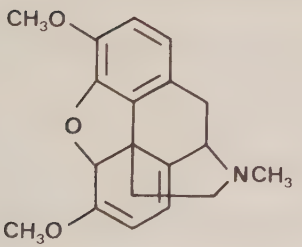
(III)



(II)



(IV)



(V)

Abb. 23 : *Neben- und Abbauprodukte des Morphins (Formeln)*

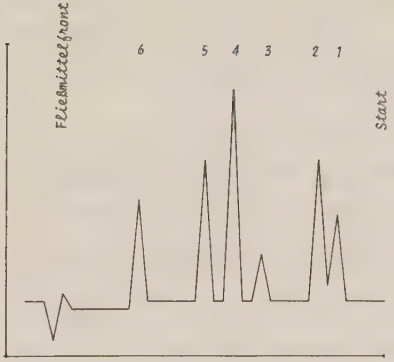
Direktauswertung von Morphin und Nebenalkaloiden auf der DC-Platte beschreiben. Ausführlich berichten ROEDER, EICH und MUTSCHLER (1971) über diese Methode, lassen jedoch die Abbauprodukte des Morphins völlig unberücksichtigt. Einen halbquantitativen dünnschichtchromatographischen Grenzkonzentrationstest auf Pseudomorphin beschreiben HAMMERSTINGL und REICH (1974), TRAPMANN und HAMMERSTINGL (1977) eine quantitative Bestimmung der Dihydromorphinon-8-sulfonsäure sowie der 7,8-Dihydromorphin-6,8-disulfonsäure mittels Remissionsmessung in sulfitstabilisierten, wäßrigen Morphinlösungen.
In der vorliegenden Arbeit soll nun versucht werden, Morphin, Codein, Thebain, Pseudomorphin und Morphin-N-oxid nebeneinander quantitativ nach dünnschichtchromatographischer Trennung mit Hilfe eines DC-Fotometers direkt auf der Platte zu bestimmen.

3.4.1. Chromatographie

Für die dünnschichtchromatographische Trennung der fünf in Frage kommenden Substanzen eignete sich nach zahlreichen Vorversuchen auf Grund von Literaturstudien (vergl. Tab.14) das Fließmittel Benzol / Aceton / Äthanol 70% / NH_3 25% (30 : 35 : 35 : 2,5 v/v). Bei einer Laufstrecke von 16 bis 17 cm und einem ausgewogenen Verhältnis der Substanzen zueinander brachte diese Fließmittelkombination die beste Trennung bei gut auswertbarer Fleckform. Die Rf-Bereiche lagen dabei für Morphin bei 0,53, Codein 0,61, Thebain 0,78, Pseudomorphin 0,29 und Morphin-N-oxid 0,20. In einigen Chargen wurde zusätzlich bei Rf 0,48 eine weitere,nicht identifizierbare Morphinverunreinigung gefunden (vergl. Abb.24).

Fließmittel \ Alkaloid	Morphin	Codein	Thebain	Pseudo-morphin	Morphin-N-oxid
Methanol 100 NH_3 25% + 1,5 [CLARKE 1969]	0,34	0,32	0,39	0,35	0,26
Benzol 35 Aceton 32,5 Äthanol 70% 35 NH_3 25% 2,5 (HAMMERSTINGL,TRAPMANN 1975)	0,41	0,53	0,81	0,05	0,06
Benzol 30 Aceton 35 Äthanol 70% 35 NH_3 25% 2,5	0,53	0,61	0,78	0,29	0,20
Xylol 40 CH_2Cl_2 20 Aceton 20 Äthanol 6 NH_3 10% 2,5 (ROEDER,EICH,MUTSCHLER 1971)	0,16	0,26	0,45	0,00	0,00
Chloroform 8 Diäthylamin 2 (GÜVEN,GÜVEN 1976)	0,63	0,89	0,90	0,15	0,00
Chloroform 20 Äthanol 20 Aceton 5 NH_3 25% 1	0,54	0,69	0,90	0,04	0,22
Chloroform 25 Aceton 20 NH_3 25% 1 (BARRET 1975)	0,06	0,15	0,38	0,00	0,00
Benzol 25 Aceton 40 Äthanol 70% 35 NH_3 25% 2,5	0,45	0,50	0,66	0,20	0,15
Chloroform 20 Äthanol 20 Aceton 15 NH_3 25% 1	0,51	0,58	0,81	0,04	0,15

Tab. 14 : R_f-Richtwerte bei Verwendung unterschiedlicher Fließmittel (Plattenmaterial : Kieselgel 60 Fertigplatten)



1 = Morphin-N-oxid *
2 = Pseudomorphin
3 = unbekannte Morphinverunreinigung
4 = Morphinhydrochlorid
5 = Codeinphosphat *
6 = Thebain *

*) diese Substanzen wurden einer handelsüblichen Morphin-HCl-Ampulle zur Verdeutlichung der Trennung in stark überhöhten Mengen zugesetzt

Fließmittel :

Benzol/Aceton/Äthanol 70%/NH_3 25%
30 : 35 : 35 : 2,5
(v/v)

Platte : Kieselgel 60 Fertigplatte

Abb. 24 : Remissionsgrad-Ortskurve (R = 285 nm) (schematisiert)

3.4.2. Auswertung

Zur Auswertung der Dünnschichtplatten stand wiederum ein DC-Fotometer der Firma Schoeffel Instruments (SD 3000) zur Verfügung. Über die Arbeitsweise dieses Gerätes wurde bereits zuvor berichtet. Ausgewertet wurde die Remissionsgrad-Ortskurve sowohl über die Peakhöhe als auch über die Fläche. Auf die Verwendung eines internen Standards (vergl. Kap.2.2.4.) wurde verzichtet, da bei manueller Auswertung der Fehler möglicherweise vergrößert wird (vergl.Kap. 2.3.5.-2.3.6.). Eine rechnergesteuerte Auswertung stand für die Versuche nicht zur Verfügung. Der Versuch, durch Ansprühen der Alkaloidflecke mit Dragendorff-Reagenz (modifiziert nach Macheboeuf und Munier) [SCHULTZ,ZYMALKOWSKI 1960] und anschließende Messung des

orangen Farbkomplexes bei 525 nm, die Empfindlichkeit der Messungen zu steigern und damit die meßbaren Nachweisgrenzen noch zu senken, erbrachte im Vergleich zur UV-Messung keinen wesentlichen Vorteil.

In der quantitativen DC wird die Auftragemenge einer Substanz durch die Faktoren der spezifischen Absorption, der Löslichkeit der zu bestimmenden Substanz sowie der Auswertbarkeit der aufgezeichneten Remissionsgrad-Ortskurve, bedingt durch das Peak/Rausch-Verhältnis, festgelegt. Sollen jedoch in einem Arbeitsgang Verunreinigungen dieser Substanz, die in der Regel in wesentlich geringeren Mengen vorliegen, mitbestimmt werden, so kommt als vierter Faktor das Verhältnis dieser Neben- und Abbauprodukte zur Hauptsubstanz hinzu. Da es gerade in der Stabilitätsanalytik darauf ankommt, nach Möglichkeit immer Haupt- und Nebenprodukte auf der selben Platte zu bestimmen, sollte im vorliegenden Falle die Eichfunktion für Morphin-HCl in einem Bereich von 10 bis 50 µg erstellt werden. In diesem Bereich ergibt sich eine lineare Abhängigkeit des Quadrates der Höhe von der aufgetragenen Menge (Tab. 15 und Abb.25). Andererseits arbeitet man bei den Neben- und Abbauprodukten wegen der geringen Menge im Bereich der linearen Abhängigkeit des Meßsignals von der Auftragemenge (BETHKE, FREI 1974; EBEL,HEROLD,HOCKE 1976b) [KUSSMAUL 1972]. Einen prozentualen Anteil, berechnet auf den Gehalt an Morphin-HCl, von ca. 0,2% für Thebain, 0,3% für Codein und Pseudomorphin und 0,1% für Morphin-N-oxid voraussetzend, sollten die Eichfunktionen dementsprechend für Thebain im Bereich von 20 bis 100 ng (Tab.16 und Abb.26), für Codein von 50 bis 250 ng

(Tab.12 und Abb.21), für Pseudomorphin von 25 bis 250 ng (Tab.17 und Abb.27) und für Morphin-N-oxid von 10 bis 50 ng (Tab.18 und Abb.28) erstellt werden.

Menge/ Fleck	Höhe	Höhe²	Fläche	Fläche²
µg	cm	cm²	cm²	cm⁴
10	7,95	57,61	7,97	63,50
20	10,89	118,59	11,11	123,40
30	12,96	167,96	15,55	241,80
40	14,93	222,90	17,17	294,81
50	16,51	272,58	18,16	329,79
Auftragevolumen : jeweils 1,0 µl				

Tab. 15 : Eichwerte für die Bestimmung von Morphin-HCl (Substanzmenge 10 bis 50 µg)

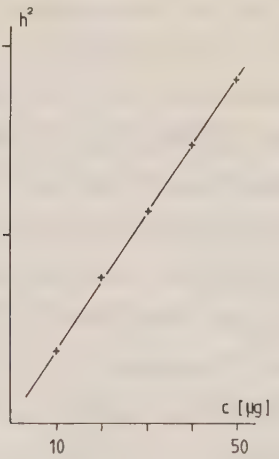


Abb. 25 : Eichfunktion für die Bestimmung von Morphin-HCl ($h^2_{(c)}$) (Substanzmenge 10 bis 50 µg)

Menge/ Fleck	Höhe	Höhe²	Fläche	Fläche²
ng	cm	cm²	cm²	cm⁴
22,45	2,25	5,06	1,01	1,02
44,9	4,3	18,49	2,0	4,0
67,35	6,95	48,3	3,14	9,86
89,8	9,25	85,56	4,0	16,0
112,25	11,35	128,82	5,11	26,11
Auftragevolumen : jeweils 1,0 µl				

Tab. 16 : Eichwerte für die Bestimmung von Thebain

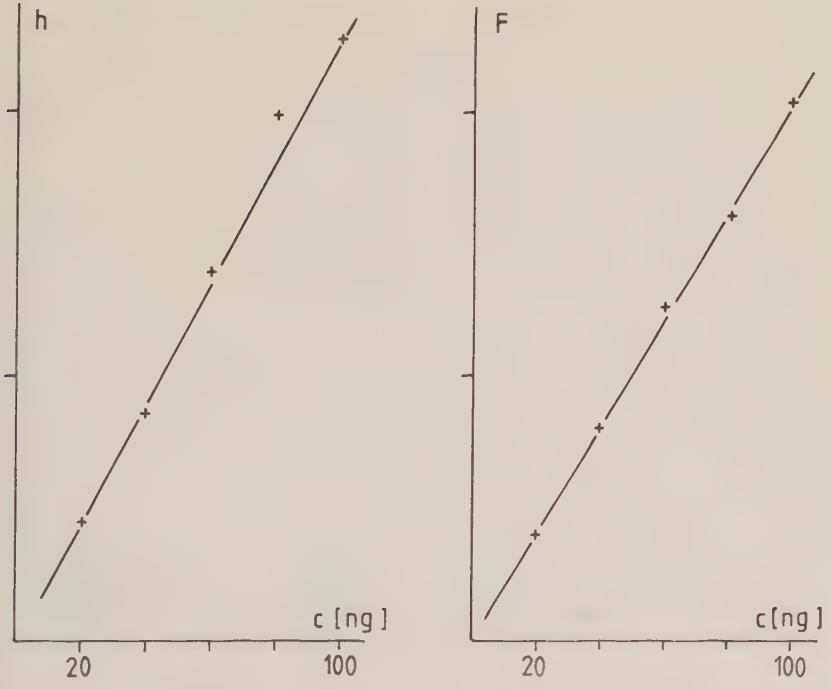


Abb. 26 : Eichfunktionen für die Bestimmung von Thebain (h , F)

Menge/ Fleck	Höhe	Höhe²	Fläche	Fläche²
ng	cm	cm²	cm²	cm⁴
25	1,65	2,72	1,16	1,35
50	3,25	10,56	2,63	6,76
100	6,2	38,44	5,02	25,2
200	10,9	118,8	9,27	85,9
250	14,8	219,0	12,26	150,3

Auftragevolumen : jeweils 1,0 µl / Fleck

Tab. 17 : Eichwerte für die Bestimmung von Pseudomorphin

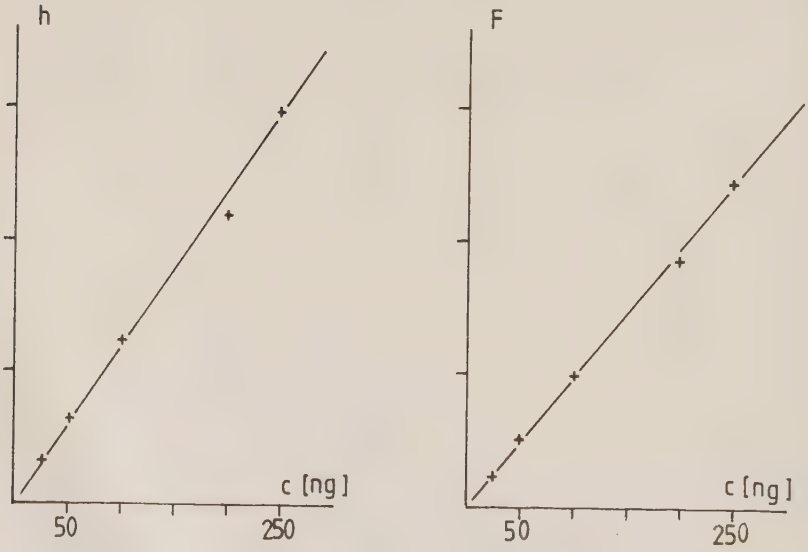


Abb. 27 : Eichfunktionen für die Bestimmung von Pseudomorphin

Menge/ Fleck	Höhe	Höhe²	Fläche	Fläche²
ng	cm	cm²	cm²	cm⁴
10	0,75	0,56	0,60	0,36
20	1,58	2,49	1,25	1,56
30	2,29	5,24	1,80	3,24
40	2,90	8,41	2,20	4,84
50	3,65	13,30	2,92	8,53
Auftragevolumen : jeweils 0,5 µl				

Tab. 18 : Eichwerte für die Bestimmung von Morphin-N-oxid

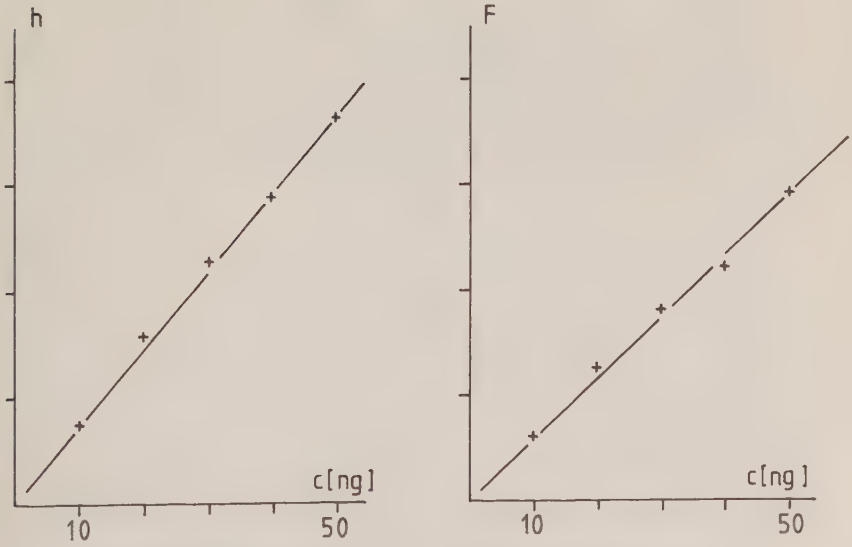


Abb. 28 : Eichfunktionen für die Bestimmung von Morphin-N-oxid (h , F)

Für Morphin besteht eine direkte lineare Abhängigkeit des Meßsignals zur Auftragemenge nur in einem Bereich von 50 bis 250 ng (Tab.19 und Abb.29). Eine Eichfunktion in diesem Bereich eignet sich jedoch nur zur alleinigen Bestimmung des Morphins ohne Berücksichtigung der Nebenprodukte, da die auf die DC-Platte aufgetragene Substanzmenge pro Fleck zu deren Erfassung nicht mehr ausreicht.

Menge/ Fleck	Höhe	Höhe²	Fläche	Fläche²
ng	cm	cm²	cm²	cm⁴
50	0,9	0,81	0,9	0,81
100	1,6	2,56	1,92	3,69
150	2,8	7,84	3,08	9,49
200	3,47	12,04	3,82	14,59
250	4,35	18,92	4,98	24,80
Auftragevolumen : jeweils 0,5 µl				

Tab. 19 : Eichwerte Morphin-HCl-Bestimmung durch Remissionsmessung Substanzmenge 50 bis 250 ng/Fleck

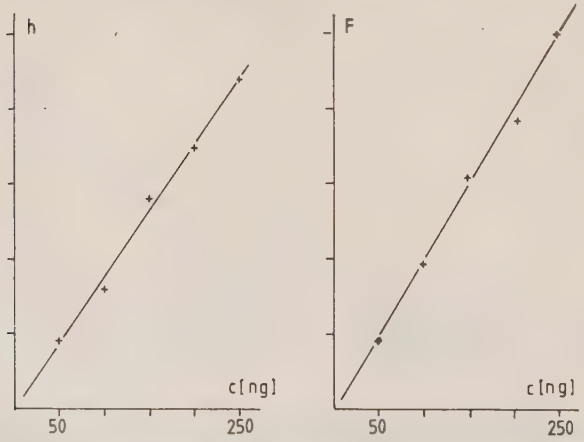


Abb. 29 : Eichfunktionen zur Bestimmung von Morphin-HCl (Substanzmenge 50 bis 250 ng/Fleck)

3.4.3. Ergebnisse

Die nachfolgende Tabelle 20 enthält die Ergebnisse der Untersuchung von sechs verschiedenen Chargen "Morphinhydrochlorid-Ampullen 0.02 g/ml" unterschiedlicher Lagerdauer. Angegeben ist der gefundene Gehalt an Morphin-HCl, Pseudomorphin, Codein und die prozentuale Umrechnung, bezogen auf den gefundenen Morphin-HCl-Gehalt.
Soweit bei einer Charge mehrere Werte aufgeführt sind, handelt es sich um unterschiedliche Lagerorte der gleichen Charge.
Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 8 Einzelwerten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß alle untersuchten Chargen, unabhängig von der Lagerdauer und von leichten Schwankungen abgesehen, im Gehalt an Morphin-HCl noch der Deklaration entsprachen. Der mittlere Gehalt an Pseudomorphin betrug 0,3% , lediglich eine Charge (Alter ca. 12 bis 13 Jahre) enthielt 1,2%. Der nachweisbare Codeingehalt lag im Mittel ebenfalls bei 0,3%. Thebain konnte nur in einer Charge und auch dort nur in Spuren nachgewiesen werden. Keine der untersuchten Ampullen enthielt Morphin-N-oxid.
Die durchschnittliche relative genäherte Standardabweichung beträgt bei den angegebenen Daten für Morphin-HCl 1,88% (Auswertung über die Peakhöhe) bzw. 2,32% (Auswertung über die Peakfläche). Die entsprechenden Daten für Codein, Thebain, Pseudomorphin und Morphin-N-oxid enthält Tabelle 21.

Charge	Herstellungs-jahr	Morphin-HCl mg/ml	Pseudomorphin mg/ml	Pseudomorphin %	Codein mg/ml	Codein %
A	weit vor 1970	20,651	0,242	1,172	n.n.	-
B	1970	21,492	0,071	0,33	0,0657	0,306
C	1974	21,494	0,066	0,307	n.n.	-
D	1974	22,478	0,056		n.n.	-
		22,712	0,062		n.n.	-
		22,396	0,056		n.n.	-
		22,529	0,058	0,257	n.n.	- *)
E	1973	22,344	0,056		n.n.	-
		22,295	0,065		n.n.	-
		22,021	0,066		n.n.	-
		22,220	0,062	0,279	n.n.	- *)
F	unbekannt ca. 1969	22,709	0,055		0,0708	0,312
		22,352	0,052		0,0698	0,312
		21,648	0,064		0,0657	0,322
		21,417	0,060		0,0535	0,250
		21,753	0,055		0,0596	0,274
		21,193	0,061		0,0651	0,307
		21,137	0,064		0,0611	0,289
		21,189	0,069		0,0618	0,292
		21,015	0,066		0,0686	0,326
		21,601	0,061	0,282	0,0640	0.296*)

*) Mittelwert der gleichen Charge unterschiedlicher Lagerung

Tab. 20 : *Quantitative Bestimmung von Pseudomorphin und Codein in Morphin-Ampullen*

Substanz	σ_{rel} bei Auswertung über die Höhe	Fläche
Codein	2,4 %	2,4 %
Thebain	1,99 %	2,98 %
Pseudomorphin	10,98 %	7,01 %
Morphin-N-oxid	2,4 %	2,6 %

Tab. 21 : Standardabweichungen Neben-/Abbauprodukte

Da Thebain und Morphin-N-oxid in den Lösungen nicht in nachweisbaren Mengen vorhanden waren, wurde die Reproduzierbarkeit der Methode an Modellösungen überprüft.
Während Pseudomorphin in den handelsüblichen Morphin-HCl-Ampullen bereits zum Zeitpunkt der Herstellung vorhanden ist (ca 0,1 %), war Morphin-N-oxid auch nach längerer Lagerung und nach Stressversuchen nicht nachweisbar. Wie auch bei der Darstellung der Reinsubstanz nach FREUND und SPEYER (1910) festgestellt werden konnte, geht das Morphin in wäßriger Lösung zum überwiegenden Anteil unmittelbar in Pseudomorphin über. In der Praxis wird deshalb vor allem die Bestimmung des Pseudomorphins von Bedeutung sein, da hierin ein echter Faktor zur Qualitätsbeurteilung von Morphinampullen zu sehen ist.
Die beschriebene Methode wird seit einiger Zeit mit gutem Erfolg in der Routineuntersuchung von frischen und gelagerten Morphinampullen eingesetzt.

4. Erarbeitung haltbarkeitsspezifischer Untersuchungsvorschriften

Am Beispiel dieser vier speziell für die Langzeitlagerung vorgesehenen Arzneimittel wurde versucht,die Anwendungsmöglichkeiten der quantitativen DC in Form der in situ-Remissionsmessung im Rahmen der Haltbarkeitsanalytik darzustellen. Das Ergebnis ist die Erarbeitung von vier Untersuchungsvorschriften, gezielt auf jeweils ein bestimmtes Arzneimittel abgestimmt und nur für dieses Arzneimittel anwendbar, und doch stellvertretend für eine Fülle von Untersuchungsvorschriften, die sich im Grunde nur durch ihre typischen Parameter - Probenvorbereitung, Fließmittel, Trennschicht, Trennverhalten, Meßwellenlänge und spezifische Extinktion - nicht aber in Technik und Analysenablauf unterscheiden. Mit jedem neuen Arzneistoff stellen sich dem Stabilitätsanalytiker dieselben Fragen, deren Beantwortung stets in der gleichen Reihenfolge ablaufen muß. Dabei sollte es stets sein Ziel sein, am Ende der Überlegungen eine aussagefähige Vorschrift erarbeitet zu haben, die eine Beurteilung über die weitere Verwendungsmöglichkeit des Arzneistoffes in positiver oder negativer Richtung zweifelsfrei zuläßt. In Abb. 29 soll abschließend versucht werden, diese Überlegungen grobschematisch zu skizzieren. Wenngleich der dabei dargestellte Analysenablauf eindeutig auf die hier verwendete Methode der quantitativen DC ausgerichtet

ist, so ist er im Grunde doch auch auf andere Analysensysteme anzuwenden. Die Methode der quantitativen DC liefert jedoch ohne großen apparativen Aufwand und in relativ kurzer Zeit aussagefähige Ergebnisse. Ihre größere Flexibilität gegenüber GC und HPLC, die im Einzelfall mit Sicherheit noch präziser und in noch kleineren Dimensionen arbeiten, ist der Vorteil,der für diese Methode spricht. Ein Fließmittel ist innerhalb weniger Minuten bereitet, eine Säule in der Gaschromatographie zu wechseln und zu stabilisieren erfordert hingegen einen wesentlich höheren Zeitaufwand. Die Arbeit soll jedoch nicht auf einen wertenden Vergleich der einzelnen Analysensysteme hinauslaufen, zumal nicht zuletzt von der Aufgabenstellung her zu entscheiden sein wird, für welche Arbeitsmethode man sich entscheidet. Der Analytiker in der Industrie beispielsweise, der zahlreiche Untersuchungen an immer wieder demselben Präparat durchzuführen hat, wird sicherlich die GC oder HPLC bevorzugen, wohingegen der Analytiker mit ständig wechselndem Analysenspektrum sich für die quantitative DC entscheiden wird.

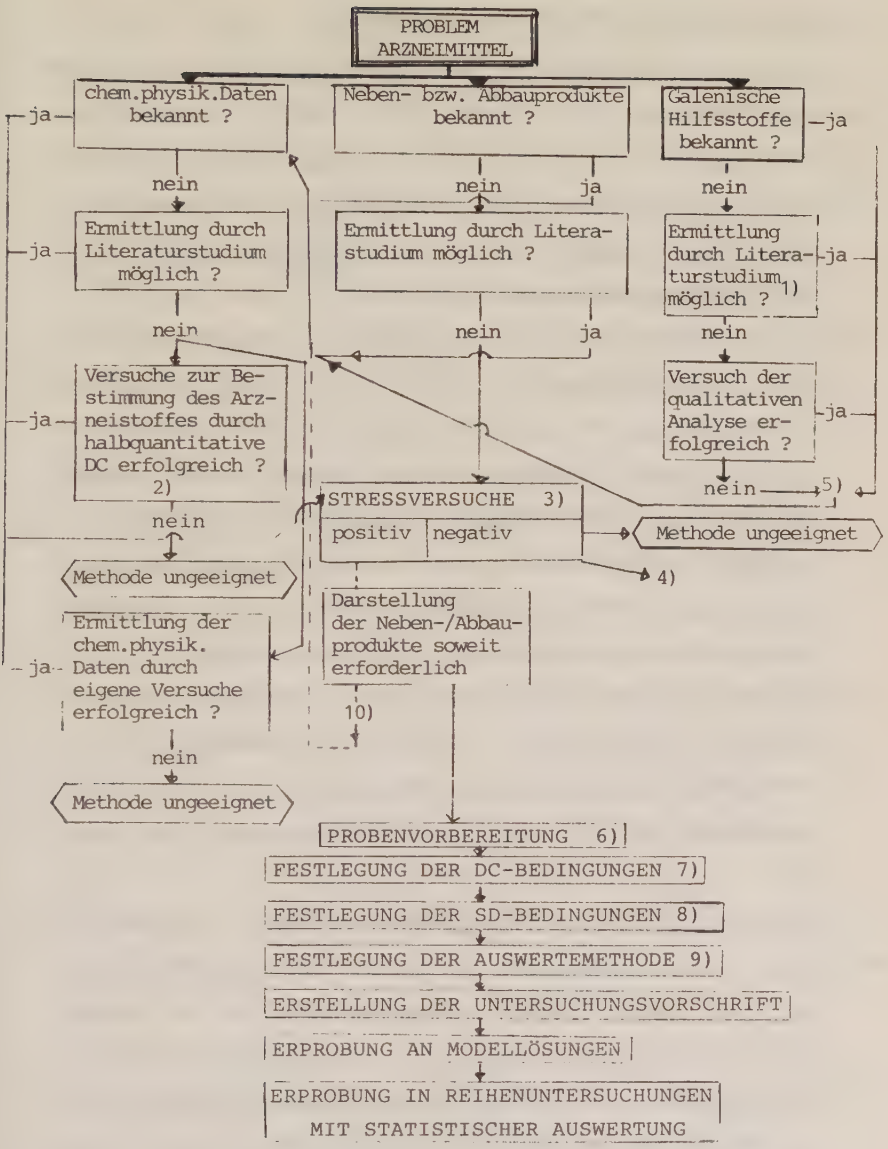


Abb. 29 : *Entwicklung einer haltbarkeitsspezifischen Untersuchungsvorschrift* (*Erläuterungen s. S. 80/81*)

Erläuterungen zu Abb. 27 :

1) Hierzu gehören auch Auskünfte durch den Hersteller, Werksvorschriften etc.
2) In dieser Stufe der Entwicklung wird versucht, für den zu untersuchenden Wirkstoff ein geeignetes Fließmittel zu finden; evtl. Neben- und/oder Abbauprodukte bleiben noch völlig unberücksichtigt.
3) Stressversuche müssen in der Stabilitätsanalytik in der Regel immer durchgeführt werden, es sei denn, das Arzneimittel und seine Neben-/Abbauprodukte sind bereits so bekannt, daß sich jeglicher weiterer Versuch erübrigt. Insbesondere aber dann, wenn die Abbauprodukte unbekannt sind, gewinnt der Analytiker hier einen Eindruck über den möglichen Grad einer Zersetzung nach bestimmten Bedingungen (erhöhte Temperatur/ erhöhte Luftfeuchtigkeit etc.) sowie über die Zahl der zu bestimmenden Zersetzungsprodukte. Auch über das ungefähre, zu erwartende prozentuale Verhältnis von Hauptsubstanz zu Abbauprodukten sowie der Abbauprodukte untereinander geben die Stressversuche Hinweise.
4) Verläuft ein Stressversuch negativ, so kann dies zwei Ursachen haben : zum einen ist die Wirksubstanz absolut stabil, zum anderen entstehen Abbauprodukte, die mit den erwarteten, bekannten Substanzen nicht identisch sind. In beiden Fällen muß die Unversehrtheit des Wirkstoffes bzw. die Identität der zusätzlichen Abbauprodukte mit anderen Analysenmethoden nachgewiesen werden.

5) Ist eine Identifizierung der galenischen Hilfsstoffe nicht möglich, ist zu prüfen, ob diese eine spätere in situ-Auswertung des Wirkstoffs bzw. der Neben-/Abbauprodukte stören. Ist dies nicht der Fall, ist im Stressversuch zu erproben, ob Änderungen am Hilfsstoff auftreten, wobei ein entsprechender Nachweis mitunter schwieriger zu führen ist, als die Entwicklung der Untersuchungsvorschrift für die reine Wirksubstanz. Treten Änderungen auf, die eine Auswertung wesentlich stören, so ist die Methode nicht geeignet.
Im positiven Falle, d.h. die Identifizierung der galenischen Hilfsstoffe ist möglich, sind sie wie die Hauptsubstanzen zu behandeln, es sei denn, auf eine densitometrische Bestimmung dieser Stoffe wird von vorneherein verzichtet, da andere Analysenmethoden zur Anwendung kommen.

6) Hierzu gehören: die Suche nach dem geeigneten Lösungsmittel (soweit noch nicht gelöst), evtl. Zerkleinerung, Verdünnung, Homogenisierung.

7) Erprobung von Fließmittelvarianten auf unterschiedlichem Plattenmaterial, Überprüfen der Rf-Werte, Korrektur der Fleckform, Erprobung von Detektionsmitteln.

8) Festlegung der Meßwellenlänge (Messung möglichst im Maximum), Scangeschwindigkeit, Empfindlichkeit des Meßgerätes, Auftragemenge.

9) Festlegung, ob Auswertung über die Höhe, die Fläche, mit oder ohne internen Standard erfolgen soll (unter Umständen muß ein geeigneter interner Standard gefunden werden).

10) Die im Stressversuch ermittelten Abbauprodukte sind (ebenso wie evtl. vorhandene Nebenprodukte) im weiteren wie die Wirksubstanz zu behandeln.

5. Beschreibung der Versuche

5.1. Bestimmung von Ephedrin

Substanzen : Ephedrin, Ephedrin-HCl, Cornecain-HCl, Paracetamol, Etilefrin-HCl - jeweils reinste Handelsqualität

Vergleichslösungen: Ephedrin-HCl / Äthanol 50% ; die Konzentration ist der Analysenlösung anzupassen

Analysenlösungen:

a) Ephedrin Tabletten Knoll^{R} :

- direkte Messung: 10 mg Tablettenmasse/ml 50% Äthanol (nach dem Lösen der Wirksubstanz gut zentrifugieren) (Auftragevolumen : 1,0 µl)
- Messung nach Anfärbung: 10 mg Tablettenmasse/ 10 ml 50% Äthanol; Lösung klar zentrifugieren (Auftragevolumen: 0,5µl)

b) Endrine^{R}-Nasentropfen :

2,66 g werden zu 50,0 ml in $CHCl_3/CH_3OH$ (6+4) gelöst (Auftragevolumen : 0,5 µl)

c) Febena EM 1^{R}- Saft :

- direkte Messung : 10,0 g Saft werden zu 20,0 ml mit Wasser verdünnt (Auftragevolumen : 2,0 µl)
- Messung nach Anfärbung : 6,0 g Saft werden zu 100,0 ml mit Wasser oder 50% Äthanol verdünnt (Auftragevolumen: 1,0 µl)

DC-Platten : DC-Fertigplatten Kieselgel 60 ; E.Merck, Darmstadt

Fließmittel : Acetonitril 50
NH_3 25% + 5,5

Sprühreagenz : 0,2 g Ninhydrin werden in 5 ml HAc gelöst, mit n-Butanol zu 100,0 ml verdünnen

Sprühen : Nach dem Entwickeln werden die Platten 15 Minuten bei 110° C getrocknet. Nach dem Abkühlen wird aus großem Abstand mäanderförmig gesprüht, wobei darauf zu achten ist, daß die Platten nicht durchfeuchten. Insgesamt wird dreimal gesprüht. Nach dem Sprühen werden die Platten 10 Minuten auf 110° C erwärmt.

Remissionsmessung : Schoeffel SD 3000

Meßwellenlänge

- bei direkter Messung ca.256 nm,
- nach Anfärbung ca.500 nm;

Meßspalt ca 5 * 0,75 mm.

5.2. Bestimmung von Metamizol / 4-Methylaminophenazon

Substanzen : Metamizol, Chloramphenicol, Nicotinsäureamid - jeweils reinste Handelsware; 4-Methylaminophenazon wurde analog der Vorschrift für die Gehaltsbestimmung des DAB 7. dargestellt.

Vergleichslösungen : 150 mg Metamizol werden in 25 ml Methanol gelöst; 20 mg 4-Methylaminophenazon werden in 100,0 ml Methanol gelöst.

Analysenlösung : 2,5 ml Ampullenlösung Novalgin^{R} werden mit Methanol p.a. auf 200,0 ml verdünnt.

Auftragemenge : jeweils 0,5 µl

Auftragetechnik : 0,5 µl Microcaps (Drummond Scientific;Vertrieb: Shandon Labortechnik, Frankfurt/M.)

DC-Platten : DC-Fertigplatten Kieselgel 60 ; E.Merck,Darmstadt

Fließmittel :

Benzol	1		Benzol	35
Aceton	1		Aceton	33
Äthanol 95%	1	(v/v)	Äthanol 95%	26
		bzw.	Wasser	11 (v/v)
		(bei Arbeiten mit internem Standard)		

DC-Fotometer : Schoeffel SD 3000 bzw. Schoeffel SD 3000(Umbauvariante) rechnergesteuert mit Hewlett-Packard HP 9810

Meßwellenlänge: ca. 275 nm; getrennte Scans für Metamizol und 4-Methylaminophenazon bei unterschiedlicher Verstärkereinstellung

Meßfläche : ca.0,5 * 10 mm bei Registrierung bzw. ca. 0,3 * 1 mm bei Rechnersteuerung; zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses empfiehlt es sich, evtl. bei 4-Methylaminophenazon eine etwas größere Meßfläche zu wählen.

5.3. Bestimmung von Codein / Methylcodein

Substanzen : Codein, Codeinphosphat und Methylcodein - jeweils reinste Handelsware

Vergleichslösungen : Codeinphosphat / Wasser; Methylcodein / Methanol; die Konzentrationen sind der Analysenlösung anzupassen, wobei mit einem Gehalt an Methylcodein von ca. 0,25 bis 0,35% gerechnet werden muß.

Analysenlösung : 130 mg fein gemörserte Tablettenmasse (≙ 30 mg Codeinphosphat) werden in 2 ml Wasser unter starkem Rühren extrahiert und anschließend zentrifugiert.

Auftragetechnik : 2,0 µl Microcaps

DC-Platten : DC-Fertigplatten Kieselgel 60; E.Merck,Darmstadt

Fließmittel :

Benzol	35	
Aceton	32,5	
Äthanol 70%	35	
NH_3 25%	2,5	(v/v)

DC-Fotometer : Schoeffel SD 3000

Meßwellenlänge : ca. 285 nm; das eigentliche Remissionsmaximum von Methylcodein liegt bei 240 nm, ist jedoch für die Routinearbeit durch das erhöhte Grundrauschen des Meßgerätes in diesem Wellenlängenbereich nicht empfehlenswert.

Meßfläche : 0,5 * 10 mm, bei Methylcodeinauswertung 1,0 * 10 mm.

Meßanordnung : - Codein : Auswertung des logarithmischen Reflexionsverhältnisses
- Methylcodein : Auswertung des linearen Reflexionsverhältnisses

5.4. Bestimmung von Morphin und seinen Neben-/Abbauprodukten

Substanzen : Morphin-HCl, Codeinphosphat, Thebain, Pseudomorphin - jeweils reinste Handelsware.
Morphin-N-oxid wurde nach den Vorschriften von FREUND und SPEYER (1910) sowie von FREUND,SPEYER und HERMINGHAUS (1915) dargestellt. Die Identität der Substanz konnte massenspektroskopisch nachgewiesen werden.

Vergleichslösungen :

- Morphinhydrochlorid : Morphinhydrochlorid / Wasser, die Konzentration wird der Analysenlösung angepaßt.
- Codeinphosphat : 80 mg Codeinphosphat DAB 7. werden in 100 ml Wasser gelöst. 10 ml dieser Lösung werden wiederum mit Wasser auf 100,o ml verdünnt.
- Thebain : 20 mg Thebain werden in 100,o ml Äthanol 96% gelöst. 10 ml dieser Lösung werden mit Äthanol auf 100,0 ml verdünnt.
- Pseudomorphin : 15 mg Pseudomorphin werden in 250 ml 0,1n HCl gelöst.
- Morphin-N-oxid : 20 mg Morphin-N-oxid werden in 100,0 ml Wasser nach Zugabe einiger Tropfen 6 N- Ammoniaks gelöst. 10,0 ml dieser Lösung werden mit Wasser auf 100,0 ml verdünnt.

Analysenlösungen :

a) Morphinhydrochloridbestimmung (ohne Berücksichtigung der Neben-/Abbauprodukte):
1,0 ml Ampullenlösung (≙ 20 mg) werden mit Wasser ad 100,0 ml aufgefüllt , Auftragevolumen : 1,0 µl

b) Morphinhydrochloridbestimmung (bei Berücksichtigung der Neben-/Abbauprodukte):
Ampullenlösung (≙ 20 mg/ml) unverdünnt, Auftragevolumen : 2,0 µl

Auftragetechnik : 1 bzw.2µl Microcaps

DC-Platten : DC-Fertigplatten Kieselgel 60; E.Merck,Darmstadt

Fließmittel : Benzol 30
Aceton 35
Äthanol 70% 35
NH_3 25% 2,5 (v/v)

DC-Fotometer : Schoeffel SD 3000

Meßwellenlänge : ca. 285 nm ; die Remissionsmaxima der untersuchten Substanzen lagen zwischen 280 und 290 nm, das Maximum für Pseudomorphin bei 240 nm. Um jedoch alle Werte bei einer Wellenlänge messen zu können, wurde bei Pseudomorphin bewußt nicht im Maximum gemessen.

Meßfläche : 0,5 * 10 mm bzw. 1,0 * 10 mm , je nach Empfindlichkeitseinstellung.

Anmerkung : Da es denkbar ist, daß in Ampullen anderer Hersteller oder nach längerer Lagerung die Neben- bzw. Abbauprodukte des Morphins mengenmäßig anders verteilt sind, sind die Vergleichslösungen bei Bedarf entsprechend anzupassen. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Pseudomorphin und Morphin-N-oxid kann es auf Grund des ähnlichen Fließverhaltens zu Störungen bei der Chromatographie kommen, die jedoch durch Beachtung aller Kriterien (z.B. Kammersättigung, lange Laufstrecke, keine wiederholte Benutzung des Fließmittels etc.) behoben werden können.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden am Beispiel von vier Arzneistoffen die Anwendungsmöglichkeiten der Direktauswertung von Dünnschichtchromatogrammen durch in situ-Remissionsmessung in der Stabilitätsanalytik aufgezeigt.

In einem allgemeinen Teil werden zunächst die Auswertemethoden mit externem und internem Standard gegenübergestellt und gezeigt, daß beide Methoden bei der Direktauswertung in der DC nicht ohne Beachtung bestimmter Mengenverhältnisse zwischen Probe und Vergleich bzw. Standard und zu bestimmender Substanz eingesetzt werden können. Hieraus ergibt sich auch, daß der Response-Faktor in der quantitativen DC im Gegensatz zur Gaschromatographie unter den gleichen Bedingungen nicht konstant ist.

Der fehlertheoretische Vergleich beider Auswertemethoden zeigt, daß eine Auswertung mit internem Standard dann zuverlässiger ist, wenn der Meßfehler kleiner als der Volumenfehler bei der Auftragung ist. Dies ist bei rechnergesteuerten Auswertungen fast immer gegeben. In der Praxis führt jedoch die Auswertung mit externem Standard bei der Bestimmung von Nebenkomponenten in der Stabilitätsanalytik zu besseren Ergebnissen, da durch die Hauptkomponente die Basislinie der Remissionsgrad-Ortskurve so gestört sein kann, daß elektronische Integratoren

nicht mehr einwandfrei arbeiten.

Im praktischen Teil werden stabilitätsspezifische Untersuchungsvorschriften für ephedrin-, metamizol-, codein- bzw. morphinhaltige Arzneimittel bei gleichzeitiger Mitbestimmung ihrer Neben- bzw. Abbauprodukte beschrieben. Von allen Arzneimitteln wurden mehrere Chargen untersucht. Dabei zeigte sich bei den ephedrinhaltigen Arzneimitteln keinerlei Zersetzung. In den Metamizol-Ampullen konnte unabhängig vom Alter der Ampullen ein Gehalt an 4-Methylaminophenazon von 3,5 bis 4,0 % gefunden werden. Handelsübliche Codeintabletten enthielten 0,3 % Methylcodein und Morphin-Ampullen zeigten bereits kurz nach der Herstellung etwa 0,30 % Pseudomorphin. Letzterer Wert steigt mit zunehmendem Alter der Ampullen an. Zwei Chargen Morphin-Lösungen zeigten Spuren von Codein, Morphin-N-oxid war nicht nachzuweisen.

Die relative genäherte Standardabweichung als Maß für die Reproduzierbarkeit der Untersuchungsmethoden schwankt in Abhängigkeit von Methode und zu bestimmender Menge zwischen 2,0 und etwa 10,0 %.

Den Abschluß der Arbeit bildet ein grobes Schema zur Erarbeitung haltbarkeitsspezifischer Untersuchungsmethoden unter besonderer Berücksichtigung der quantitativen DC.

Literaturverzeichnis

ALTINKURT,T., Eczacilik Bülteni 18 (3), 42 (1976)
[A.A. 32, 2 E 46 (1977)]

AWE,W. u. TRACHT,H.G., Pharm.Ztg 108, 1356 (1963)

BARRET,P.C., Proc.Analyt.Div.Chem.Soc. (London) 1975 , 271

BETHKE,H. u. FREI,R.W., J.Chromatogr. 91, 433 (1974)

BETHKE,H., SANTI,W. u. FREI,R.W. , J.Chromatogr.Sci. 12, 392 (1974)

BÖHME,H. u. HARTKE,K.(Hrsg.) : Kommentar zum DAB 7.Ausgabe; Wissenschaftl.Verlagsgesellschaft, Stuttgart (1968)

BÖHME,H. u. HARTKE,K.(Hrsg.) : Kommentar zum Europäischen Arzneibuch Bd. I u. II; Wissenschaftl.Verlagsgesellschaft, Stuttgart (1976)

BOEHRINGER,C.H.,INGELHEIM , Qualitätskontrolle,Privatmitteilung (1976)

CHOULIS,N.H. u. CAREY,C.E., J.Pharm.Sci. 57, 1048 (1958)

CLARKE,E.G.C. : Isolation and Identification of Drugs; Pharmaceutical Press, London (1969)

CLIFFORD,A.A. : Multivariete Error Analysis ; Applied Science Publ., London (1973)

EBEL,S. : Handbuch der Arzneimittelanalytik ; Verlag Chemie, Weinheim (1977)

EBEL,S.,GEITZ,E. u. HOCKE,J., Fresenius Z.Anal.Chemie (im Druck , 1979)

EBEL,S.,GLASER,E. u. MOHR,H., Fresenius Z.Anal.Chemie 293, 33 (1978)

EBEL,S.,GLASER,E. u. ROST,D., J.High Resol.Chromat. 1, 250 (1978)

EBEL,S.,GLASER,E. u. SEURING,A., Fresenius Z.Anal.Chemie 291, 108 (1978)

EBEL,S. u. HEROLD,G., Fresenius Z.Anal.Chemie 270, 19 (1974)

EBEL,S. u. HEROLD,G., Chromatographia 8, 35 (1975)

EBEL,S. u. HEROLD,G., Arch.Pharm. 308, 839 (1975)

EBEL,S. u. HEROLD,G., Fresenius Z.Anal.Chemie 273, 7 (1975)

EBEL,S.,HEROLD,G. u. HOCKE,J., Achema Vortrag (1976)

EBEL,S.,HEROLD,G. u. HOCHE,J., Instrument u. Forschung 1976 (3), 42

EBEL,S. u. HOCKE,J., J.Chromatog. 126, 449 (1976)

EBEL,S. u. HOCKE,J., Chromatographia 10, 123 (1977)

EBEL,S. u. HOCKE,J., J.High Resol.Chromat. 1, 156 (1978)

EBEL,S. u. ROST,D., Arch.Pharm. 311 , 914 (1978)

EBEL,S. u. ROST,D., Arch.Pharm. 312 , 100 (1979)

EICH,E.,GEISSLER,H.,MUTSCHLER,E. u. SCHUNACK,W., Arzneim. Forsch. 19, 1895 (1969)

EICHHORN,A. u. KNY,L., Zbl.Pharm. 112, 567 (1973)

FREI,R.W., SANTI,W. u. THOMAS,M., J.Chromatogr. 116, 365 (1976)

FREUND,M. u. SPEYER,E., Berichte der D.Chem.Gesellschaft 43, 3310 (1910)

FREUND,M.,SPEYER,E. u.(HERMINGHAUS,H.), Berichte der D.Chem. Gesellschaft 48, 497 (1915)

GÜVEN,K.C. u. GÜVEN,N., Eczacilik Bülteni 18, 14 (1976)

HAMMERSTINGL,H. u. REICH,G., J.Chromatog. 101, 408 (1974)

HAMMERSTINGL,H. u. TRAPMANN,H., Fresenius Z.Anal.Chemie 274, 30 (1975)

HEROLD,G., Dissertation Marburg (1975)

JANSSEN PHARMACEUTICA, Privatmitteilung (1977)

KAISER,R.E. : Chromatographie in der Gasphase ; Bibliograph. Institut, Mannheim (1965)

KLAUS,R., J.Chromatogr. 40, 235 (1965)

KLAUS,R., J.Chromatogr. 62, 99 (1971)

KROSS,W.,KRÖTSCH,U. u. TRAPMANN,H., Pharm.Ztg 120, 1502 (1975)

KUSSMAUL,H., Dissertation Marburg (1972)

LANG,E., Fresenius Z.Anal.Chemie 253, 32 (1971)

LANG,R. u. REICH,G., Wehrmed.Monatsschrift 13, 342 (1969)

LUDWIG,R. : Methoden der Fehler- und Ausgleichsrechnung ; Verlag Vieweg, Braunschweig (1969)

MACEK,K. : Pharmaceutical Applications of Thin-Layer and Paper Chromatography ; Elsevier Publ.Comp., Amsterdam (1972)

MC.MULLAN,E.A.u. HEVERAN,J.E. in TOUCHSTONE,J.C.(Hrsg.) : Quantitative Thin Layer Chromatography; Wiley , New York (1975)

NUNOURA,S.,IWAGAMI,S.,MIZUTO,Y.u. YOKOYAMA,H., Osaka Furitsu Koshu Eisci Kenkyusho Kenkyu Hokoku 1975 (9), 35 [C.A. 87, 141322 (1977)]

PAULUS,H., Privatmitteilung (1974)

PECHTOLD,F., Arznm.Forschung 14, 1328 (1964)

PFEIFFER,S., Pharmazie 18, 409 (1963)

de POTTER,W.D. et. al., Experientia 21, 1048 (1958)

ROEDER,K.,EICH,E. u. MUTSCHLER,E., Arch.Pharm. 304, 297 (1971)

SARSUNOVA,M. u. CHI,N.T.K., Ceskosl.Farm. 15, 474 (1966) [C.A. 66, 79621 (1967)]

SCHLEMMER,W. u. KAMMERL,E., J.Chromatogr. 82, 143 (1973)

SCHOEFFEL INSTRUMENTS INC., Unterlagen zum SD 3000

STAHL,E. : Dünnschichtchromatographie ; Springer-Verlag, Heidelberg (1967)

SCHULTZ,O.E. u. ZYMALKOWSKI,F. : Die quantitative Bestimmung der Alkaloide in Drogen und -zubereitungen, Bd. 47 d.Chem.Analyse; Verlag Enke, Stuttgart (1960)

STEFFENS,U., Dissertation Marburg (1977)

STEINIGER,M., Pharm.Ztg 32, 1187 (1968)

TAUSCH,W., Meßtechnik 80, 38 (1971)

THOMA,K. : Arzneimittelstabilität , Frankfurt (1978)

TOPPING,J. : Fehlerrechnung ; Verlag Chemie , Weinheim (1976)

TRAPMANN,H. u. HAMMERSTINGL,H., Pharm.Ztg 122, 310 (1977)

ULLMANN´S ENZYKLOPÄDIE der techn.Chemie, Bd.3 ; Verlag Urban & Schwarzenberg, München-Berlin (1953)

VROMBAUT,R., THOMAS,L. u. COORMAN,H., Pharm.Tijdschr.Belg. 46 (9), 197 (1969)[C.A. 72, 24671 (1970)]

WEITKAMP,H. u. BARTH,R. : Einführung in die Infrarot-Spektrometrie ; Thieme , Stuttgart (1976)

YEH,S. u. LACH,J.L., J.Pharm.Sci. 50, 30 (1961)

Lebenslauf

	R o s t
	Dieter
Geburtstag	11.02.1945
Geburtsort	Apolda , Kreis Weimar / Thüringen
Vater	Helmut Rost , Bankprokurist i.R.
Mutter	Käte Rost geb. Vallender
Schulbesuch	1951 - 1955 Volksschule Bonn-Poppelsdorf
	1955 - 1965 Friedrich Ebert-Gymnasium Bonn
Abitur	15.02.1965
Wehrdienst	01.04.1965 - 31.03.1967
Praktikantenzeit	01.04.1967 - 30.09.1969 Glocken-Apotheke, Witterschlick b.Bonn
Vorexamen	11.09.1969 (Köln)
Studium (Pharmazie)	WS 1969 / SS 1970 Bamberg
	WS 1970 / WS 1972 Bonn
Staatsexamen/Approbation	25.01.1973 / 28.03.1973
Studium (Lebensmittelchemie)	WS 1972 / WS 1974 Bonn
Staatsexamen	04.10.1974
beruflich tätig seit	07.10.1974 als Apotheker und Lebensmittelchemiker an der Chemischen Untersuchungsstelle der Bundeswehr IV in Koblenz :
	10/74 - 05/75 Wasseranalytik
	seit 05/75 Arzneimittelanalytik
verheiratet seit	21.07.1970
mit	Birgit Rost geb. Frank
Kinder	Antje Rost , geb. 22.02.1971
	Jutta Rost , geb. 09.12.1973
	Felix Rost , geb. 21.02.1977

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren

Constabel, Ebel, Fraunberger, Gabel, Glombitza, Goenechea, Gstirner, Haupt, Haustein, Henecka, Hohenester, Holleck, Jäger, Kalbhen, Kolb, Krieglstein, List, Müller, Pachaly, Pelz, Pfeilsticker, Reimann, Roeder, Rosenmund, Roth, Sievers, Steiner, Stille, Thofern, Tscheche und Zymalkowski.